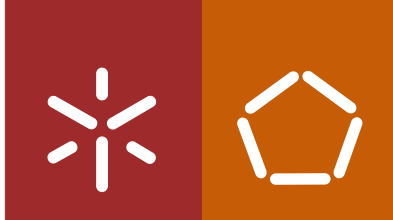


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Daniela Filipa Pires Lopes

**Deteção de gliadinas em alimentos para recém-nascidos com intolerância ao glúten por recurso a um sistema de multi-sensores**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Daniela Filipa Pires Lopes

**Deteção de gliadinas em alimentos para recém-nascidos com intolerância ao glúten por recurso a um sistema de multi-sensores**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da

**Professora Doutora Lígia Raquel Marona Rodrigues**

(Departamento de Engenharia Biológica,

Universidade do Minho)

do

**Professor Doutor António Manuel Coelho Lino Peres**

e do

**Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias**

(Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança)

# DECLARAÇÃO

**Nome:** Daniela Filipa Pires Lopes

**Título da dissertação:** Detecção de gliadinas em alimentos para recém-nascidos com intolerância ao glúten por recurso a um sistema de multi-sensores

**Orientadores:** Professora Doutora Lúcia Raquel Marona Rodrigues, Professor Doutor António Manuel Coelho Lino Peres e Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

**Ano de conclusão:** 2016

**Designação do Mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Ramo Tecnologia Química e Alimentar

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 19 de Outubro de 2016

Assinatura: \_\_\_\_\_

*"Todas as vitórias ocultam uma abdicação." (Simone de Beauvoir)*



## Agradecimentos

Gostaria de deixar presente nesta secção um sincero agradecimento a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Peres, meu orientador da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), pelos conhecimentos partilhados e pelo apoio prestado na realização deste trabalho

Ao Professor Doutor Luís Dias, meu orientador da ESA do IPB, pelo acompanhamento direto do meu trabalho, pelos conhecimentos partilhados, pela orientação, pela disponibilidade, pela paciência e por todo o apoio prestado na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Lígia Rodrigues, minha orientadora da Universidade do Minho, pela orientação, pela disponibilidade e pelo interesse prestado na realização deste trabalho.

Ao Eng.º Jorge Sá Morais, do Laboratório de Cromatografia da ESA do IPB, pela paciência, pelos conhecimentos partilhados e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os investigadores e responsáveis do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da ESA, em particular à Andreia Tomás e à Ângela Fernandes, pela simpatia e pelo apoio prestado.

À D. Olinda Antunes, da Residência Universitária de Santa Tecla em Braga, pelo apoio e pela amizade ao longo desta jornada.

A todos os amigos e familiares que estiveram sempre presentes ao longo desta caminhada, em especial à minha avó Especiosa e ao meu avô Sebastião, pelo apoio, carinho e atenção que sempre me deram.

Por último, tendo consciência de que sozinha nada disto seria possível, deixo o meu maior obrigado aos meus pais Anabela Pires e Viriato Lopes e ao meu namorado Domingos Afonso, pelo apoio incondicional, pela paciência, pelo incentivo, pela amizade e pela ajuda na superação dos obstáculos que foram surgindo ao longo desta caminhada. A eles dedico este trabalho!



## Resumo

A doença celíaca tem como principal característica a intolerância ou hipersensibilidade à ingestão de prolaminas presentes no trigo, centeio, cevada e aveia. As prolaminas, conhecidas como gliadinas, constituem cerca de 50% das proteínas do glúten do trigo. Uma dieta livre de glúten é o principal meio de tratamento para a doença celíaca. Nesse sentido, torna-se necessário encontrar metodologias de análise alternativas capazes de detetar e quantificar o teor de glúten nos alimentos. Na presente dissertação fez-se um estudo da deteção de gliadinas em alimentos para recém-nascidos com intolerância ao glúten recorrendo a um sistema alternativo de análise de produtos alimentares – sistema de multi-sensores – por comparação com métodos analíticos de referência – HPLC, espectrofotometria UV-Vis e método de Bradford, usando diferentes soluções de extração (tampão fosfato com 0,1% de SDS e solução hidro-etanólica (80%)). O principal objetivo deste estudo foi estabelecer a distinção entre papas de bebé em pó com glúten e sem glúten (com e sem gliadinas). A discriminação entre os alimentos analisados teve por base a capacidade de um sistema de multi-sensores para fornecer diferentes perfis potenciométricos consoante os diferentes conteúdos de gliadinas presentes nas papas de bebé e farinhas, após extração com a solução hidro-etanólica. Os perfis de sinais, obtidos a partir do sistema de multi-sensores, em conjunto com métodos estatísticos multivariados de reconhecimento de padrões, nomeadamente a análise discriminante, foram usados para a distinção entre papas com glúten e sem glúten. Foram analisadas 2 farinhas (com glúten) e 12 papas comercializadas em Portugal e adquiridas em farmácias e supermercados: 6 com indicação de ausência de glúten no rótulo e 6 com indicação da presença de glúten no rótulo. A concentração de gliadinas das amostras analisadas foi confirmada por cromatografia líquida de alta resolução, após extração. O sistema de multi-sensores usado mostrou-se eficaz na diferenciação de alimentos com e sem glúten (com e sem gliadinas) apresentando valores de seletividade e sensibilidade superiores a 95%, indicativo de uma metodologia prática para uma discriminação preliminar destes dois tipos de produtos.

**Palavras-chave:** glúten; gliadinas; papas de bebé; solução hidro-etanólica





## Abstract

Celiac disease is characterized by the intolerance or hypersensitivity to the ingestion of prolamines that are present in wheat, barley and oats. Prolamines, known as gliadins, correspond to about 50% of the wheat gluten proteins. A gluten-free diet is the primary means of treatment for celiac disease. Accordingly, it is necessary to find alternative methods of analysis that are able to detect and quantify gluten in food. In the present work a study to detect gliadins in foods for infants intolerant to gluten using an alternative system for the analysis of food products – multi-sensor system – by comparison with the analytical reference methods – HPLC, UV-Vis spectrophotometry and Bradford method – was conducted, using different extraction solvents (phosphate buffer with 0.1% SDS and hydro-ethanolic solution (80%)). The aim of this study was to develop an alternative method to distinguish between baby food gluten-free and containing gluten (gliadins-free and containing gliadins). The discrimination between the baby food samples evaluated was based on the ability of the multi-sensor system to provide different potentiometric profiles depending on the different gliadins content that were present in the baby food and flour after extraction with a hydro-ethanolic solution. The signal profiles obtained from the multi-sensor system, together with multivariate statistical methods of pattern recognition, namely the discriminant analysis, were used to distinguish between baby food with gluten and gluten-free. Overall, we analyzed 2 flour (containing gluten) and 12 baby food samples that are commercialized in Portugal and can be purchased from pharmacies and supermarkets: 6 indicating in the labels that are ‘gluten-free’ and another 6 samples containing gluten. The gliadin concentration of the samples was confirmed by high resolution liquid chromatography after extraction. The multi-sensor system used has proved effective in differentiating food with gluten and gluten-free (containing gliadins and gliadins-free) having selectivity and sensitivity levels higher than 95%, indicative of a practical methodology for preliminary discrimination of these two types of products.

**Keywords:** gluten; gliadins; baby food; hydro-ethanolic solution



# Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos e organização da dissertação .....	2
1.2. Revisão Bibliográfica .....	3
1.2.1. Importância do glúten .....	3
1.2.2. Proteínas do glúten .....	4
1.2.3. Doença celíaca .....	5
1.2.4. Legislação e limites de tolerância de glúten .....	6
1.2.5. Métodos de detecção e análise do glúten .....	7
1.2.6. Língua eletrônica .....	7
2. Materiais e Métodos .....	9
2.1. Amostragem.....	10
2.2. Reagentes e Solventes .....	10
2.3. Quantificação da proteína total.....	10
2.3.1. Soluções de extração de gliadinas .....	14
2.3.2. Análise da proteína total.....	15
2.3.2.1. Soluções padrão de albumina .....	15
2.3.2.2. Soluções padrão de gliadina.....	16
2.3.2.3. Amostras .....	16
2.3.2.4. Método de Bradford .....	17
2.3.2.5. Análise de espectros UV-Vis .....	18
2.4. Análise de gliadinas em alimentos por HPLC.....	18
2.4.1. Equipamento .....	18
2.4.2. Preparação de soluções.....	19
2.4.3. Análise de gliadinas por HPLC .....	19
2.5. Análise de gliadinas em alimentos por sistema de multi-sensores .....	20
2.5.1. Sistema de multi-sensores .....	20
2.5.2. Equipamento .....	22
2.5.3. Preparação de soluções.....	22

2.5.4. Análise de gliadinas por sistema de multi-sensores.....	23
2.5.5. Métodos estatísticos .....	23
3. Resultados e Discussão .....	25
3.1. Método de Bradford.....	26
3.2. Extração de gliadinas com solução tampão fosfato com SDS .....	27
3.3. Extração de gliadinas com solução hidro-etanólica.....	29
3.4. Análise de gliadinas em alimentos por HPLC.....	31
3.5. Análise de gliadinas usando espectros UV-Vis.....	35
3.6. Análise de gliadinas em alimentos por sistema de multi-sensores .....	37
4. Conclusões .....	41
Referências Bibliográficas .....	43
Anexos .....	47
Anexo A: Resultados dos ensaios experimentais de teste .....	48
Anexo A1: Dados das retas de calibração usadas nos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB.....	49
Anexo A2: Resultados dos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB para soluções padrão.....	52
Anexo A3: Resultados dos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB para misturas de amostras com padrão .....	63
Anexo B: Retas de calibração.....	65
Anexo B1: Reta de calibração para o estudo da extração de gliadinas com tampão fosfato com SDS.....	66
Anexo B2: Reta de calibração para o estudo da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica.....	67
Anexo B3: Reta de calibração para a análise de gliadinas por HPLC .....	68
Anexo C: Resultados das extrações .....	69
Anexo C1: Resultados da extração de gliadinas com tampão fosfato com SDS .....	70
Anexo C2: Resultados da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica .....	72
Anexo D: Resultados da análise por HPLC.....	75
Anexo D1: Resultados obtidos da análise de gliadinas por HPLC.....	76
Anexo E: Modelos de regressão linear .....	78
Anexo E1: Modelo de regressão linear múltipla na análise de gliadinas usando espectros UV-Vis.....	79

Anexo E2: Modelo de regressão linear múltipla na análise de gliadinas usando um sistema de multi-sensores .....	80
Anexo F: Discriminação de produtos alimentares.....	81
Anexo F1: Discriminação de produtos alimentares na análise de gliadinas por sistema de multi-sensores .....	82

## Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da composição do glúten.....	5
Figura 2: Sistema de multi-sensores com 2,5 cm de largura de 9,5 cm de comprimento. ....	21
Figura 3: Esquema de montagem do sistema para análise com língua eletrónica.....	22
Figura 4: Perfis cromatográficos obtidos por HPLC, a 210 nm, para as soluções padrão de gliadina (concentrações entre 162 mg/L e 757 mg/L) usadas na reta de calibração. ....	32
Figura 5: Espectro UV-Vis típico para gliadina. ....	32
Figura 6: Espectros UV-Vis das soluções hidro-etanólicas de padrão de gliadina (6 níveis de concentração: 162 a 757 mg/L) e 4 amostras de papas de bebé com (CG) e sem (SG) glúten usando o MB.....	35
Figura 7: Relação entre as concentrações de gliadina previstas pelo melhor modelo de regressão linear múltipla obtido e os valores obtidos por HPLC. ....	37
Figura 8: Relação linear entre os valores de concentração de gliadinas estimados pelo algoritmo de melhoramento local restringido (MLR) obtido e os valores obtidos pelo método HPLC. ....	40
Figura B1: Reta de calibração com soluções padrão de BSA (concentrações entre 21 mg/L e 700 mg/L) preparadas em tampão fosfato com SDS. ....	66
Figura B2: Reta de calibração com soluções padrão de BSA (concentrações entre 125 mg/L e 1500 mg/L), obtidas com o kit do MB, preparadas em solução hidro-etanólica. ....	67

Figura B3: Reta de calibração com soluções padrão de gliadina (concentrações entre 161 mg/L e 757 mg/L) preparadas em solução hidro-etanólica e medidas por HPLC. ....	68
Figura E1: Resultados obtidos na validação do modelo de regressão linear múltipla para a quantificação das concentrações de gliadinas usando espectros UV-Vis. ....	79
Figura E2: Resultados obtidos na validação do modelo de regressão linear múltipla para a quantificação das concentrações de gliadinas usando um sistema de multi-sensores. ....	80
Figura F1: Discriminação entre produtos alimentares com (group cg) e sem (group sg) glúten usando dados analíticos obtidos com a língua eletrônica. ....	82

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Descrição das amostras de acordo com a informação do rótulo .....	11
Tabela 2: Lista de reagentes e solventes .....	14
Tabela 3: Resultados da extração de gliadinas com 10 mL de tampão fosfato com SDS de soluções padrão de gliadina e amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten (valores individuais apresentados no Anexo C) .....	28
Tabela 4: Resultados da extração de gliadinas com 10 mL, 50 mL e 60 mL de solução hidro-etanólica de soluções padrão de gliadina, amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten) (valores individuais apresentados no Anexo C) .....	30
Tabela 5: Resultados da análise de gliadinas por HPLC obtidos para amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten) extraídas em solução hidro-etanólica (valores individuais apresentados no Anexo C) .....	34
Tabela 6: Extratos hidro-etanólicos das amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten) usadas na análise de gliadinas com a língua eletrônica ...	38
Tabela A1: Resultados para o declive, ordenada na origem e respectivos erros para as retas de calibração com soluções padrão de BSA preparadas com diferentes soluções de extração.....	49

Tabela A2: Resultados da extração de gliadinas com diferentes soluções de extração de soluções padrão de glúten e soluções padrão de gliadina .....	52
Tabela A3: Resultados da extração de gliadinas com 10 mL de tampão fosfato com SDS de misturas de amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten com padrão de gliadina.	63
Tabela C1: Resultados da extração de gliadinas com 10 mL de tampão fosfato com SDS de soluções padrão de gliadina e amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten .....	70
Tabela C2: Resultados da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica de soluções padrão de gliadina, amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten).....	72
Tabela D1: Resultados da análise de gliadinas por HPLC obtidos para amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten), extraídas em solução hidro-etanólica.....	76





## Abreviaturas

**ACN** – Acetonitrilo

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**BSA** – Albumina de soro bovino (abreviatura de *Bovine Serum Albumin*)

**CE** – Eletroforese capilar (abreviatura de *Capillary Electrophoresis*)

**DC** – Doença Celíaca

**ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimático (abreviatura de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**ESA** – Escola Superior Agrária

**GC** – Cromatografia Gasosa (abreviatura de *Gas Chromatography*)

**HMW** – Alto peso molecular (abreviatura de *High Molecular Weight*)

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência (abreviatura de *High Performance Liquid Chromatography* ou *High Pressure Liquid Chromatography*)

**IPB** – Instituto Politécnico de Bragança

**LD** – Limite de Detecção

**LQ** – Limite de Quantificação

**MALDI** – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (abreviatura de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

**MB** – Método de Bradford

**MLR** – Melhoramento Local Restringido

**PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida (abreviatura de *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

**PCR** – Reação em cadeia de polimerase (abreviatura de *Polymerase Chain Reaction*)

**LE** – Língua Eletrónica

**LMW** – Baixo peso molecular (abreviatura de *Low Molecular Weight*)

**SA** – Arrefecimento simulado (abreviatura de *Simulated Annealing*)

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio (abreviatura de *Sodium Dodecyl Sulfate*)

**TFA** – Ácido Trifluoracético

**THF** – Tetrahidrofurano

**UV-Vis** – Ultravioleta-Visível



---

# 1. Introdução

## 1.1. Objetivos e organização da dissertação

No âmbito desta dissertação, pretendeu-se realizar um estudo para deteção de gliadinas em alimentos para recém-nascidos, nomeadamente papas de bebé em pó, por recurso a um sistema de multi-sensores. Este estudo decorreu no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

Com a realização deste estudo pretendeu-se encontrar metodologias de análise alternativas capazes de detetar e quantificar o teor de glúten e, consequentemente, o teor de gliadinas, em alimentos para recém-nascidos, bem como a discriminação de papas de bebé com glúten e sem glúten (com gliadinas e sem gliadinas).

Esta dissertação encontra-se organizada em quatro capítulos com o intuito de apresentar o trabalho desenvolvido. No primeiro capítulo, apresenta-se uma breve revisão da literatura contendo os conceitos mais importantes que estão relacionados com o tema em estudo. No segundo capítulo, constam os materiais e métodos usados no estudo desenvolvido. Por sua vez, no terceiro capítulo apresentam-se os principais resultados obtidos e respetiva discussão. Por último, no quarto capítulo faz-se uma síntese das principais conclusões decorrentes de todo o trabalho desenvolvido em torno do tema desta dissertação, bem como a apresentação de perspectivas de trabalho futuras.

## 1.2. Revisão Bibliográfica

A doença celíaca caracteriza-se pela intolerância ou hipersensibilidade à ingestão de prolaminas existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. As proteínas do glúten do trigo contêm aproximadamente 50% de prolaminas, denominadas por gliadinas (Peres et al., 2011). O tratamento para a doença celíaca consiste numa dieta livre de glúten. Nesse sentido, é importante dispor de metodologias analíticas eficazes no que diz respeito à deteção e quantificação do teor de glúten, particularmente, em alimentos rotulados “sem glúten” destinados à alimentação de recém-nascidos.

No presente estudo pretende-se investigar o desempenho de um sistema de multi-sensores – língua eletrónica (LE) – potenciométrico na deteção de gliadinas em alimentos, dando continuidade a estudos desenvolvidos anteriormente por Peres et al., (2011) na análise semi-quantitativa de gliadinas em alimentos. É de realçar que neste estudo serão analisadas amostras de papas de bebé em pó, com e sem glúten, e farinhas (com glúten) usando duas soluções de extração distintas, nomeadamente tampão fosfato (0,1 mol/L) com SDS (0,1%) usado num estudo anterior por Lambrecht et al., (2015) em que se obteve um rendimento médio de extração de  $81\pm 5\%$  em glúten e solução hidro-etanólica (70%) usada por Meirinho (2009) em que se obteve um rendimento médio de extração de  $46\pm 20\%$  em gliadinas.

Nas secções seguintes apresenta-se uma breve introdução aos conceitos relacionados com o tema em estudo, nomeadamente o glúten e sua composição, doença celíaca, legislação e limites de tolerância de glúten e metodologias de deteção e análise do glúten.

### 1.2.1. Importância do glúten

O trigo é um dos cereais com ampla aplicação a nível mundial, quer em termos de produção quer na utilização para a alimentação humana. A composição química do trigo, bem como as suas propriedades estruturais, definem-no como uma fonte importante de energia, proteína e fibra (Scheuer et al., 2011).

De entre os constituintes do trigo, as proteínas são as principais responsáveis pela sua funcionalidade, podendo destacar-se a capacidade de absorção de água, a coesividade e as propriedades viscoelásticas da massa que, determinam a capacidade da farinha de trigo em ser

transformada em diferentes alimentos (pão, massas, bolachas, bolos, pizzas, entre outros) (Arendt & Bello, 2008; Gallagher, 2009; Scheuer et al., 2011). Os grãos de trigo contêm entre 8% a 20% de proteínas. As proteínas do glúten constituem 80% a 85% da percentagem total de proteínas da farinha (Meirinho, 2009).

De acordo com a solubilidade, em solução de etanol e água (solução hidro-etanólica), as proteínas do glúten podem dividir-se em gliadinas, caso sejam solúveis, e em gluteninas, caso sejam insolúveis, sendo que ambas apresentam grandes concentrações de glutamina e prolina.

No que diz respeito às propriedades reológicas das massas, estas são condicionadas pelo teor em gliadinas e gluteninas. As gliadinas, quando em contacto com a água, têm pouca elasticidade e apresentam menos coesividade, comparativamente com as gluteninas. As gliadinas contribuem particularmente para a viscosidade e extensibilidade da massa. Em contrapartida, as gluteninas quando hidratadas são coesas e elásticas e conferem força e elasticidade à massa (Arendt & Bello, 2008; Gallagher, 2009).

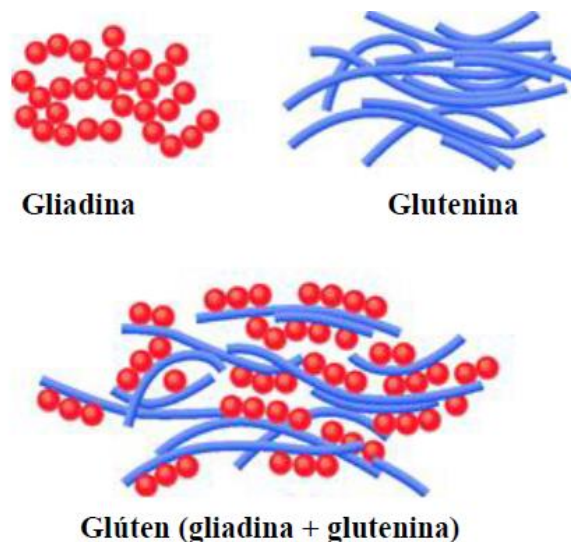
Hoje em dia, é possível encontrar no mercado vários produtos sem glúten. A ausência de glúten resulta, frequentemente, de processos de hidrólise enzimática (Carreira et al., 2011).

### **1.2.2. Proteínas do glúten**

De acordo com a caracterização bioquímica, o glúten é constituído por quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e as globulinas representam aproximadamente 15% das proteínas, os restantes 85% correspondem às proteínas monomérica e polimérica, gliadina e glutenina (Figura 1), respetivamente (Arendt & Bello, 2008; Gallagher, 2009).

As proteínas da farinha de trigo pouco solúveis em água são normalmente designadas por glúten de trigo. As gliadinas e as gluteninas encontram-se em quantidades semelhantes no glúten de trigo, pelo que se torna necessário encontrar um meio de diferenciação. Como referido anteriormente, estas proteínas podem ser distinguidas tendo em conta a sua solubilidade em etanol, ou seja, as gliadinas são solúveis numa solução hidro-etanólica (60%, por exemplo), enquanto as gluteninas são insolúveis nesta mesma solução (Meirinho, 2009). As gluteninas são polímeros que podem subdividir-se em gluteninas de alto (HMW) e baixo (LMW) peso molecular. Por sua vez, as gliadinas são proteínas monoméricas que apresentam na sua classificação

frações  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -, por ordem decrescente da sua mobilidade. Deste modo, grande parte das gliadinas encontra-se sob a forma de monómeros e apresentam massas molares compreendidas entre 28000 g/mol e 50000 g/mol (Scheuer et al., 2011).



**Figura 1:** Representação esquemática da composição do glúten.

Fonte: <http://omundodotrigo.blogspot.pt/2015/06/a-gliadina-e-uma-proteina-simples.html> (consultado em Junho de 2016).

### 1.2.3. Doença celíaca

A enteropatia sensível ao glúten, mais comumente designada por doença celíaca (DC), é uma doença intestinal inflamatória crónica, auto-imune permanente, que se manifesta em indivíduos com tendência para a sensibilidade ao glúten. A ingestão de glúten, mesmo que em quantidades reduzidas, pode levar ao desenvolvimento de reações imunológicas no intestino delgado, causando lesões na sua mucosa que podem traduzir-se na redução da capacidade de absorção de nutrientes essenciais, como o ferro, o ácido fólico, o cálcio e vitaminas lipossolúveis.

A DC pode manifestar-se em qualquer idade. Contudo, o habitual é surgir entre os 6 e os 20 meses de idade, depois da introdução de farinhas na alimentação, como é o caso das papas de bebé (em estudo neste trabalho). A eliminação do glúten na alimentação permite que o intestino regenere por completo. No entanto, se houver reintrodução do glúten, as inflamações regressam (Celíacos, 2016).



Tal como referido anteriormente, o glúten é um composto proteico, sendo as gliadinas (sobretudo a fração  $\alpha$ -) as principais responsáveis pela manifestação clínica da doença (Arendt & Bello, 2008; Gallagher, 2009). As gliadinas impulsionam o sistema imunitário para a produção de autoanticorpos que, são como uma espécie de proteína produzida pelo sistema imune, capaz de atuar contra uma ou mais proteínas produzidas pelo organismo humano. Os autoanticorpos apresentam propriedades físico-químicas e bioquímicas semelhantes às dos outros anticorpos. A principal diferença reside nas propriedades imunológicas, uma vez que estes estão relacionados com doenças auto-imunes (doenças que resultam de reações imunes contra as células e tecidos do organismo) (Vaz, 2009).

#### 1.2.4. Legislação e limites de tolerância de glúten

Segundo a Comissão do *Codex Alimentarius*, o glúten é entendido como “a fração proteica do trigo, cevada, centeio e aveia, suas variedades cruzadas e derivados, a que algumas pessoas são intolerantes e que é insolúvel em água e numa solução de 0,5 mol/L de cloreto de sódio” (Codex Alimentarius, CODEX STAN 118-1979, 2008). O valor nutricional do glúten é inferior, comparativamente com o das proteínas de origem animal. No entanto, a principal vantagem da sua utilização reside nas características físicas e funcionais e no seu baixo custo (Arendt & Bello, 2008; Pité, 2008).

Na norma do *Codex Alimentarius* os alimentos isentos de glúten são descritos como: “constituídos por, ou elaborados apenas a partir de ingredientes que não contêm quaisquer prolaminas de trigo ou de todas as espécies de *Triticum*, tais como espelta, kamut ou trigo duro, centeio, cevada, aveia ou as suas variedades híbridas com um nível glúten que não exceda os 20 mg/kg” ou “elaborado com ingredientes a partir de trigo, centeio, cevada, aveia, espelta ou suas variedades híbridas, que foram tornadas sem glúten; com um nível não superior a 100 mg/kg”. De acordo com o Regulamento de Execução N°828/2014 da Comissão de 30 de Julho de 2014, a legislação europeia exige uma prestação obrigatória de informação aos consumidores sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten nos géneros alimentícios. Este regulamento encontra-se em vigor desde 20 de Julho de 2016 (Codex Alimentarius, CODEX STAN 118-1979, 2008; Comissão Europeia, 2014).

### 1.2.5. Métodos de detecção e análise do glúten

Garantir que um alimento está isento de glúten é de extrema importância para os doentes celíacos. A análise de glúten constitui um desafio, uma vez que o glúten consiste numa mistura de proteínas insolúveis em água. Em alimentos comerciais (como por exemplo, pão, massas, bolachas, papas, entre outros) o glúten encontra-se numa gama de matrizes complexas que podem ser modificadas pelo calor e processamento dos alimentos. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, eficazes, de baixo custo, com sensibilidade e seletividade e facilmente validadas (Ermer & Miller, 2005).

As técnicas mais frequentemente utilizadas para detetar e/ou quantificar proteínas de trigo são a eletroforese em géis de poliacrilamida (A-PAGE e SDS-PAGE); cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) e exclusão de tamanho (SE-HPLC); eletroforese capilar (CE); ensaios imunoenzimáticos (ELISA); ensaios de imunofluorescência competitivos homogêneos para a determinação da gliadina utilizando gliadina marcada com térbio; espectroscopia de fluorescência; espectroscopia de massas MALDI-TOF; métodos baseados em ADN, tais como, reação em cadeia da polimerase (PCR e RT-PCR) e citometria de fluxo (Arendt & Bello, 2008; Gallagher, 2009; Peres et al., 2011).

### 1.2.6. Língua eletrónica

Na análise de alimentos com matrizes complexas, as principais técnicas instrumentais de análise são baseadas em métodos de separação, como por exemplo, a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (CE), entre outros. Estas técnicas apresentam várias desvantagens, tais como: são análises demoradas; requerem equipamento especializado e caro; necessitam de um pré-tratamento das amostras para a análise; entre outras.

Uma língua eletrónica (LE) é um sistema de multi-sensores com sensores não específicos e de baixa seletividade (Vlasov et al., 2005), ou seja, um sistema constituído por sensores químicos com resposta reprodutível, de elevada estabilidade e sensibilidade cruzada a diferentes espécies em solução. A LE fornece perfis de sinais que representam a informação global sobre as amostras, como se se tratasse de um “espectro” da amostra. Como os perfis de

sinais são dados multivariados é preciso recorrer à quimiometria para o seu tratamento de forma a extrair informação e atingir os objetivos analíticos, que podem ser de análise qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa (Dias M. S., 2013).

As LEs podem ter vários princípios de deteção, sendo os mais frequentes a potenciometria (Zakaria et al., 2011; Escriche et al., 2014), voltametria (Wei, Wang, & Liao, 2010; Tiwari et al., 2013) e impedância (Ulloa et al., 2013). O tipo de sensores utilizados num sistema de multi-sensores depende do princípio de deteção, dos materiais disponíveis e do trabalho que se pretende efetuar. Neste trabalho usou-se uma língua eletrónica potenciométrica contendo sensores de membrana lipídica polimérica (Toko, 2000; Dias et al., 2011) que, são sensores de sensibilidade cruzada (não específicos ou de baixa seletividade) para diferentes compostos presentes na matriz líquida (Máñez et al., 2005). Como exemplos de aplicação de sistemas similares na área alimentar ao nível da análise qualitativa pode-se referir a discriminação de sumos com base nos níveis de sumos de fruta adicionados à bebida (Dias et al., 2011), a identificação de adulterações no leite de cabra por adição de leite de vaca (Dias et al., 2009) e a classificação e distinção do mel de diferentes regiões de Portugal (Dias et al., 2008). Estas LEs permitem estudos comparativos com a análise sensorial devido à informação global (perfil de sinais dos sensores) sobre amostras complexas que dificilmente poderá ser obtida com outras metodologias analíticas (Dias M. S., 2013; Dias et al., 2008). Outras vantagens resultam da vantagem prática na utilização de sensores potenciométricos como, por exemplo, não necessitarem ou requererem pré-tratamento da amostra e permitirem não só a discriminação das características das amostras alimentares, mas também avaliar a qualidade global dos alimentos (Dias et al., 2008).

Como referido anteriormente, os sistemas de multi-sensores originam dados experimentais multivariados referentes a cada amostra. Nesse sentido, esta metodologia está acoplada a ferramentas estatísticas multivariadas para extrair a informação desejada. Neste campo usam-se técnicas quimiométricas que dependem do tipo de estudo efetuado. Por exemplo, em análise qualitativa a técnica mais comum é a análise discriminante linear e na análise quantitativa as técnicas mais comuns são a regressão linear múltipla e o método dos mínimos quadrados (Toko, 2000; Dias et al., 2009; Dias et al., 2011).

---

## **2. Materiais e Métodos**

Neste capítulo descreve-se a amostragem efetuada, assim como os reagentes e solventes, equipamento, procedimentos e condições experimentais usados nos métodos de análise das gliadinas.

## 2.1. Amostragem

A amostragem efetuada teve como objetivo recolher amostras de papas de bebé em pó, com (CG) e sem (SG) glúten, e farinhas (com glúten). As amostras de papas e farinhas foram adquiridas em farmácias e supermercados, com base na informação dos rótulos. Na Tabela 1 apresenta-se a informação presente no rótulo de cada amostra.

A composição global das papas é complexa. É de realçar que as farinhas com glúten usadas na preparação destes produtos são de trigo, aveia, cevada, centeio, painço e arroz. Verifica-se também que algumas farinhas são integrais e outras sofrem hidrólise, o que significa que o conteúdo em glúten é reduzido através de um processo enzimático em que se dá a quebra das moléculas de proteínas em péptidos mais pequenos. Neste âmbito, nas amostras com glúten (CG2, CG3, CG4, CG5 e CG6) esperam-se níveis baixos de glúten, uma vez que a farinha usada na sua composição é integral ou foi hidrolisada.

## 2.2. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes usados neste trabalho foram todos de qualidade para análise, sendo que não foram sujeitos a nenhuma purificação adicional. A lista de reagentes e solventes encontra-se na Tabela 2.

## 2.3. Quantificação da proteína total

Nesta secção encontra-se a descrição do equipamento, soluções padrão, modo de preparação de soluções e extratos usados na análise de gliadinas em amostras de papas de bebé em pó usando espectrofotometria UV-Vis através do Método de *Bradford* (MB).

**Tabela 1:** Descrição das amostras de acordo com a informação do rótulo

Amostra <sup>*1</sup>	Presença de Glúten	Destinatários [Faixa etária]	Ingredientes	Indicações
SG1;SG4 <sup>*2</sup>	Não	A partir dos 4 meses	Cereais 29% - amido de milho e farinha de arroz; Leite desnatado em pó 22%; Proteínas do leite; Açúcar; Maltodextrina; Gordura vegetal - palma; Sais minerais - cálcio, fósforo e ferro; Emulgente - lecitina de soja; Vitaminas - C, niacina, E, ácido pantotênico, B1, B6, A, ácido fólico, K1, biotina, D3 e B12; Aroma - vanilina.	Papa elaborada com dois cereais, o milho e o arroz, que não contém glúten, pelo que é indicada na introdução dos primeiros cereais na alimentação do bebé. Enriquecida com vitaminas e cálcio.
SG2	Não	A partir dos 4 meses	Farinhas 49,8% - farinha de arroz hidrolisada e arroz; Leite em pó magro 24,6%; Frutas desidratadas 15,5% - maçã, banana e pêra; Amido e milho; Maltodextrina; Emulsionante - lecitina de girassol; Óleos vegetais - palma, colza, coco e girassol; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, fumarato ferroso, sulfato de zinco e iodeto de potássio; Cultura de bifidobactérias; Vitaminas - C, PP, E, B1 ácido pantotênico, A, B6, K, ácido fólico, biotina e D; Aromatizante - vanilina.	nd
SG3	Não	A partir de 6 meses	Leite de transição 44%; Leite magro em pó; Óleos vegetais - palma, colza, coco e girassol; Emulsionante - lecitina de soja; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, difosfato férrico, sulfato de zinco, sulfato de cobre e iodeto de potássio; Vitaminas - C, niacina, pantotenato, E, B1, A, B6, ácido fólico, K1, D3, biotina e B12; Farinha de arroz 29%; Açúcar; Leite magro em pó; Amido - batata e milho; Soro desmineralizado em pó; Aroma de baunilha natural; Canela; Aroma - vanilina.	Acondicionado em atmosfera protetora.
SG5	Não	A partir dos 4 meses	Maçã 40%; Cereais 23% - amido de milho e farinha de arroz; Leite desnatado em pó 15%; Proteínas do leite; Maltodextrina; Gordura vegetal - palma; Sais minerais - cálcio, fósforo e ferro; Emulgente - lecitina de soja; Vitaminas - C, niacina, E, ácido pantotênico, B1, B2, B6, A, ácido fólico, K1, biotina, D3 e B12; Aroma - vanilina.	Papa mono fruta (maçã) elaborada com cereais sem glúten (milho e arroz) indicada para iniciação do sabor a fruta. Sem adição de açúcar (contém açúcares naturalmente presentes). Enriquecida com vitaminas e cálcio.

\*1) SG – sem glúten

\*2) Papas de lotes diferentes.

Tabela 1 (continuação)

Amostra <sup>*1</sup>	Presença de Glúten	Destinatários [Faixa etária]	Ingredientes	Indicações
SG6	Não	A partir dos 4 meses	Cereais 72% - farinha de milho e amido de milho; Açúcar; Maltodextrina; Gordura vegetal - palma; Sais minerais – cálcio e fósforo; Vitaminas - C, niacina, E, ácido pantotênico, B1, B6, A, ácido fólico, K1, biotina e D3; Emulgente - lecitina de soja; Aroma - vanilina.	Papa mono cereal (milho) sem glúten, indicada para engrossar o leite do biberão ou para dar à colher. Enriquecida com vitaminas e cálcio.
CG1	Sim	A partir de 6 meses	Cereais 66% - farinha de trigo, farinha de aveia, farinha de cevada, amido de milho, farinha de arroz e farinha de centeio; Maltodextrina; Gordura vegetal - palma; Sais minerais - cálcio e fósforo; Vitaminas - C, niacina, E, ácido pantotênico, B1, B6, A, ácido fólico, K1, biotina, D3; Emulgente - lecitina de soja; Aroma - vanilina; Sem adição de sacarose.	Papa multicereais (trigo, milho, cevada, centeio e arroz) enriquecida com vitaminas e cálcio, indicada para a introdução do glúten na alimentação do bebê.
GG2	Sim	A partir de 6 meses	Farinhas 49,2% - farinha de trigo hidrolisada e trigo; Leite em pó magro 23,7%; Frutas desidratadas 14,3% - maçã; Amido de milho; Maltodextrina; Emulsionante - lecitina de girassol; Óleos vegetais - palma, colza, coco e girassol; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, fumarato ferroso, sulfato de zinco e iodeto de potássio; Aroma de maçã; Cultura de bifidobactérias; Vitaminas - C, PP, E, B1 ácido pantotênico, A, B6, D, K, ácido fólico e biotina; Aromatizante - vanilina.	nd
CG3	Sim	A partir de 6 meses	Leite de transição 44%; Leite magro em pó; Óleos vegetais - palma, colza, coco e girassol; Emulsionante - lecitina de soja; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, difosfato férrico, sulfato de zinco, sulfato de cobre e iodeto de potássio; Vitaminas - C, niacina, pantotenato, E, B1, B6, A, ácido fólico, K1, D3, biotina e B12; Farinha de cereais 33% - arroz, aveia integral, trigo integral cevada integral, painço integral, milho e centeio integral; Maçã em pó 10%; Oligossacáridos - galacto-oligossacáridos e polifrutose; Soro desmineralizado em pó.	Acondicionado em atmosfera protetora.

\*1) SG – sem glúten; CG – com glúten.

Tabela 1 (continuação)

Amostra <sup>*1</sup>	Presença de Glúten	Destinatários [Faixa etária]	Ingredientes	Indicações
CG4	Sim	A partir de 6 meses	Farinhas 75,2% - farinha de trigo hidrolisada e trigo; Açúcar; Leite em pó 7,6%; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, fumarato ferroso, sulfato de zinco e iodeto de potássio; Vitaminas - C, E, PP, A, B1, B6, ácido fólico e D; Aromatizante - vanilina; Cultura de bifidobactérias.	nd
CG5	Sim	A partir de 6 meses	Farinhas 54,8% - farinha de trigo hidrolisada e trigo; Leite parcialmente desnatado 32,4%; Sacarose; Óleo de girassol; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, fumarato ferroso, sulfato de zinco e iodeto de potássio; Cultura de bifidobactérias; Vitaminas - C, PP, E, B1 ácido pantotênico, A, B6, K, ácido fólico, biotina e D; Aromatizante - vanilina.	nd
CG6	Sim	A partir de 6 meses	Cereais 53% - farinha de trigo parcialmente hidrolisada; Leite magro em pó 26%; Gordura vegetal; Óleos vegetais - palma, colza, coco e girassol; Emulsionante - lecitina de soja; Açúcar; Substâncias minerais - carbonato de cálcio, pirofosfato férrico e iodeto de potássio; Aromatizante - vanilina; Vitaminas - C, niacina, E, pantotenato, B6, B1, A, ácido fólico, D3, K1 e B12.	Papa de sabor simples com matéria-prima rigorosamente selecionada e controlada. Os cereais são hidrolisados enzimaticamente.
P	Sim	nd	Farinha de trigo.	Produzida a partir de trigos selecionados. Indicada para todos os usos culinários.
PD	Sim	nd	Farinha de trigo.	Indicada para usos culinários.

\*1) CG – com glúten; PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2.



Tabela 2: Lista de reagentes e solventes

Reagente/Solvente	Marca	Observações
Ácido fosfórico – $\text{H}_3\text{PO}_4$	<i>Merck</i>	
Hidróxido de Sódio – $\text{NaOH}$	<i>Panreac</i>	
Fosfato disódico – $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	<i>Panreac</i>	
Dihidrogeno fosfato de sódio – $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	<i>Panreac</i>	
Albumina bovina – BSA	<i>Sigma-Aldrich</i>	
Dodecil sulfato de sódio – SDS	<i>Acros Organics</i>	
Gliadina	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>Gladin from wheat (G3375)</i>
Glúten	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>Gluten from wheat (G5004)</i>
Acetonitrilo – ACN	<i>Merck</i>	Pureza superior a 99,8%
Ácido trifluoracético – TFA	<i>Acros Organics</i>	Pureza mínima de 99%
Água desionizada	nd	Obtida a partir de um sistema de desionização <i>TGI Pure Water Systems</i> , fornecido pela empresa ATS
Etanol	<i>Panreac</i>	
Tetrahydrofurano – THF	<i>Sigma-Aldrich</i>	

### 2.3.1. Soluções de extração de gliadinas

Neste trabalho testaram-se duas soluções de extração tendo em consideração os resultados apresentados em trabalhos anteriores:

- Tampão fosfato, 0,1 mol/L, com 0,1% de SDS, referido como uma solução de extração de glúten com rendimento médio de  $81\pm 5\%$  (Lambrecht et al., 2015).
- Solução hidro-etanólica (20:80, v/v), que permite a extração de  $46\pm 20\%$  de gliadinas (Meirinho, 2009; Peres et al., 2011).

De modo a verificar se era possível obter a percentagem de extração indicada no estudo de Lambrecht et al., (2015), as condições de extração foram adaptadas testando diferentes valores de pH e temperatura. Nesse sentido as soluções tampão fosfato foram preparadas por mistura de duas soluções e sendo o valor pH monitorizado com um elétrico combinado acoplado a um potenciômetro (*HANNA instruments*), até obter o valor de pH desejado, da seguinte forma:

- pH 2,3 e pH 4 por mistura de uma solução de 0,1 mol/L de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  com 1 mol/L de  $\text{NaOH}$ ;

- pH 8, pH 6, pH 9 e pH 10 por mistura de uma solução 0,1 mol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  com uma solução 0,1 mol/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;
- pH 12 e pH 13,6 por mistura de uma solução 0,1 mol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  com uma solução 1 mol/L de NaOH.

As condições de temperatura foram monitorizadas através de um banho termostático onde se testaram as temperaturas de 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 49 °C e temperatura ambiente. As soluções padrão e amostras foram submetidas a estas temperaturas durante um período de cerca de 2 horas.

### 2.3.2. Análise da proteína total

As soluções a seguir referidas são, em geral, semelhantes às usadas no estudo do método de extração mais eficaz. A principal diferença diz respeito à preparação das soluções, onde a solução de extração usada corresponde a uma das soluções de extração estudadas.

Em ambos os métodos quer as soluções padrão quer as amostras foram homogeneizadas num *vortex*, da *lbr instruments V05 series*, durante 5 minutos, sendo seguidamente sujeitas a um banho de ultrassons da *Elma*, modelo *Transsonic 460/H*, durante cerca de 10 minutos, e deixadas a estabilizar *overnight*, uma vez que se verificou que o fator tempo tinha influência na dissolução das soluções.

#### 2.3.2.1. Soluções padrão de albumina

Nos ensaios de extração de gliadina com o tampão fosfato com SDS, a análise de proteínas totais foi efetuada com o método de *Bradford* (MB), usando na calibração soluções padrão de BSA, com concentrações entre 21 mg/L e 700 mg/L, preparadas em tampão fosfato com SDS. Assim, a matriz de todos os ensaios é semelhante em todas as soluções minimizando possíveis erros experimentais associados às diferenças na matriz.

Nos ensaios com a solução de extração hidro-etanólica foi usado o *kit Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay*, da *Pierce*, por estar referido que a análise das proteínas totais não sofre interferências dos elevados níveis em etanol. Nesse sentido, as soluções padrão de BSA, com concentrações entre 125 mg/L e 1500 mg/L, usadas para calibração, foram obtidas a

partir de diluições (usando a solução hidro-etanólica) da solução concentrada de BSA (2000 mg/L), fornecida no *kit*, em concordância com as instruções de fábrica.

#### 2.3.2.2. Soluções padrão de gliadina

As soluções padrão de gliadina foram usadas para verificar o rendimento da extração alcançado com cada uma das soluções de extração estudadas. No estudo da extração de gliadinas com o tampão fosfato com SDS, preparam-se 6 soluções padrão de gliadina, com massas compreendidas entre 0,010 g e 0,012 g, em 10 mL de tampão.

No estudo da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica, usando as soluções e os procedimentos indicados no *kit*, preparam-se 6 e 12 soluções padrão de gliadina, com massas compreendidas entre 0,02 g e 0,5 g, em 50 mL e 10 mL de solução, respectivamente, para testar o método analítico de análise de gliadinas por HPLC. É de salientar que estas soluções foram também analisadas por espectrofotometria UV-Vis.

#### 2.3.2.3. Amostras

Nos ensaios de extração com o tampão fosfato com SDS, foram preparadas 6 amostras de papas de bebê (SG1, SG2, SG3, CG1, CG2 e CG3) com 9 réplicas cada, com massas compreendidas entre 0,010 g e 0,015 g, em 10 mL de tampão. Estas amostras foram analisadas por MB e por espectrofotometria UV-Vis.

Nos ensaios de extração com solução hidro-etanólica foram preparadas as seguintes amostras:

- 6 amostras de papas de bebê (SG1, SG2, SG3, CG1, CG2 e CG3), com 4 g em 60 mL de solução.
- 2 amostras (SG2 e SG3) com 3 réplicas cada; 3 amostras (CG4, CG5 e CG6); 4 amostras (SG1, SG4, SG5 e SG6) com 2 réplicas cada e 4 amostras (CG1, CG2 e CG3) com 4 réplicas cada, de papas de bebê, com 2 g em 10 mL de solução.
- 2 amostras (PD e P) com 5 réplicas cada, de farinhas, com 2 g em 10 mL de solução.

Estas amostras foram analisadas pelo MB, por espectrofotometria UV-Vis e, posteriormente, por HPLC.

- 2 amostras (PD e P) com 12 réplicas cada, de farinhas, com massas compreendidas entre 0,1 g e 10 g em 50 mL de solução.
- 2 amostras (SG2 e SG3) com 2 réplicas cada, de papas de bebé, com 10 g em 50 mL de solução.

Estas amostras foram analisadas por MB e por espectrofotometria UV-Vis. Posteriormente, também foram analisadas por HPLC e sistema de multi-sensores potenciométrico.

#### 2.3.2.4. Método de *Bradford*

A quantificação de proteínas totais a partir de um método sensível, expedito e que sofra poucas variações é, geralmente, um requisito importante na prática laboratorial de purificação de proteínas. O método de *Bradford* (MB) é expedito, fácil, rápido e barato, pelo que cumpre parte dos requisitos requeridos na quantificação de proteínas.

As soluções padrão e as amostras foram colocadas em contacto com uma solução do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, da *Fisher Scientific*. A cada uma das soluções padrão e amostras foram adicionados 5 mL de corante que, por sua vez, se ligou aos aminoácidos básicos ou aromáticos e, em consequência dessa ligação deu-se um desvio no máximo de absorção de 465 nm – forma vermelha do corante – para 595 nm – forma azul do corante. As análises foram efetuadas num espectrofotómetro, da *Analytik Jena AG*, *SPERCORD 200*. Para a quantificação e tratamento de dados foi usado o *Software WinASPECT*, versão 1.7.2.0.

A quantificação das soluções padrão de BSA em tampão fosfato com SDS fez-se recorrendo à leitura das absorvâncias, numa gama de comprimento de onda compreendida entre 190 nm e 1100 nm. É de salientar que nos ensaios com a solução de extração tampão fosfato com SDS se espera uma diminuição na qualidade do modelo linear (menor estabilidade), uma vez que este último composto (o SDS) interfere na análise espectrofotométrica.

**Método de *Bradford* com *kit*.** A quantificação das soluções padrão de BSA em solução hidro-etanólica fez-se por meio de um agitador de microplacas, da *StatFax-2100*. Por sua vez, a leitura das microplacas foi feita num leitor de microplacas, da *BioTek Instrument*, modelo ELx800 a um comprimento de onda de 595 nm e, o registo dos valores das absorvâncias medidas foi feito com o programa Gene5.

#### 2.3.2.5. Análise de espectros UV-Vis

A quantificação das gliadinas por espectrofotometria UV-Vis (espectrofotómetro *Analytik Jena AG*) foi feita a partir da leitura das absorvâncias, numa gama de comprimento de onda compreendida entre 190 nm e 1100 nm, nas soluções padrão de albumina (exceto as obtidas com o *kit*) (secção 2.3.2.1), nas soluções padrão de gliadina (secção 2.3.2.2) e nas amostras (secção 2.3.2.3). Os valores das absorvâncias foram aplicados à respetiva curva de calibração, definida pelas soluções padrão de albumina (secção 2.3.2.1), para determinar as respetivas concentrações.

### 2.4. Análise de gliadinas em alimentos por HPLC

Nesta secção encontra-se a descrição do equipamento, soluções padrão, modo de preparação de soluções e extratos usados na análise de gliadinas em amostras de papas de bebé em pó e farinhas, assim como as condições cromatográficas aplicadas por HPLC.

#### 2.4.1. Equipamento

Nas análises de gliadinas por HPLC usou-se um cromatógrafo da *ProStar*, equipado com uma bomba *Varian ProStar 220* e um injetor automático da *Rheodyne* e modelo 7725i (*loop* de 10 µL). Na deteção foi usado um detetor *Varian ProStar 330 Photodiode Array* e para a quantificação e tratamento de dados o *Software Star Chromatography Workstation*, versão 6.4. A separação cromatográfica foi realizada por meio de uma coluna cromatográfica PLRP-S da *Polymer Laboratories*, constituída por um polímero de poliestireno divinilbenzeno (tamanho de partículas 8 µm, de poro 300 Å, 150×4,6 mm d.i.), colocada no interior de um forno da marca *Jones Chromatography*, modelo 7981 a 40 °C.

Na degaseificação dos eluentes utilizou-se um banho de ultrassons da *Elma*, modelo *Transsonic 460/H*.

### 2.4.2. Preparação de soluções

As soluções padrão de gliadina (secção 2.3.2.2) usadas foram as analisadas com o *kit* do MB que permitiu definir a concentração de gliadinas extraída em cada solução que, por sua vez, corresponde à proteína total. Estas soluções foram usadas no estudo da extensão de extração da solução hidro-etanólica. No caso das amostras, por estas terem variados constituintes na sua composição, a proteína total não corresponde à proteína em gliadina. Por essa razão, e para confirmar estes níveis, foram analisadas por HPLC. Para tal, prepararam-se amostras usando o procedimento de extração descrito na secção de análise de proteína total (secção 2.3.2) para as amostras (secção 2.3.2.3) com solução hidro-etanólica.

A separação e quantificação das gliadinas foram feitas após injeção, num injetor automático, de 10 µL de amostra. Para tal, foram usados dois eluentes:

- Solvente A) 99% de água desionizada, 1% de ACN e 0,01% de TFA (v/v).
- Solvente B) 99% de ACN, 1% de água desionizada e 0,01% de TFA (v/v).

Ambos os eluentes foram filtrados com uma membrana de nylon, de porosidade 0,2 µm, num sistema de filtração por vácuo, sendo posteriormente submetidos a desgaseificação num banho de ultrassons durante 5 minutos.

Todas as amostras e soluções padrão foram sujeitos a uma filtração prévia, por meio de um filtro de nylon, da *Whatman*, de porosidade 0,2 µm (*Puradisc 25 NYL*), para *vials*.

### 2.4.3. Análise de gliadinas por HPLC

Após o estudo de diferentes gradientes de eluente, verificou-se que a melhor resolução cromatográfica para as gliadinas era obtida usando um gradiente de 20%-80% de solvente B, durante 30 minutos. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 0,6 mL/min à temperatura de 40 °C e deteção feita a 210 nm.

Os picos das gliadinas presentes nos espectros UV-Vis das amostras de papas de bebé e farinhas em análise foram identificados comparando os tempos de retenção obtidos para as soluções padrão de gliadina e, através da análise do espectro UV-Vis associado a cada um dos picos. Estes espectros foram registados numa gama de comprimento de onda compreendida

entre 190 nm e 400 nm, sendo que o espectro lido a 210 nm foi o que permitiu uma maior sensibilidade.

A calibração do equipamento de HPLC foi efetuada usando soluções padrão de gliadina com concentrações no intervalo [162; 757] mg/L obtidas pelo MB, uma vez que a extração do padrão de gliadina não era completa. O modelo linear estabelecido permitiu ainda calcular os limites de detecção (eq. 1) e quantificação (eq. 2) por cálculo através das equações que se seguem:

$$LD = 3.3 \times \left( \frac{s}{m} \right) \dots\dots\dots (eq. 1)$$

$$LQ = 10 \times \left( \frac{s}{m} \right) \dots\dots\dots (eq. 2)$$

onde *s* corresponde ao desvio padrão da resposta (desvio da ordenada na origem) e *m* ao declive ou coeficiente angular da curva analítica. Estes limites são parâmetros importantes na análise por HPLC, uma vez que determinam a partir de que concentração a amostra pode ser detetada (LD) ou quantificada (LQ) (Ribani et al., 2004).

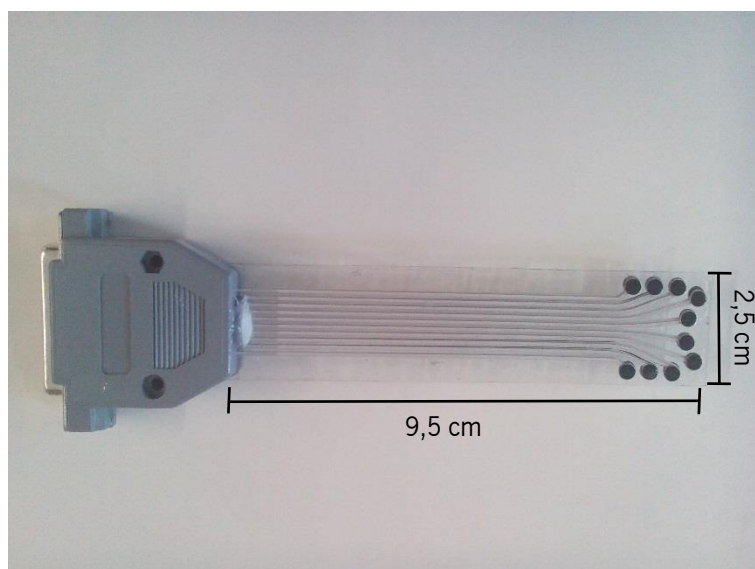
## 2.5. Análise de gliadinas em alimentos por sistema de multi-sensores

Nesta secção encontra-se a descrição da montagem do sistema de multi-sensores, do equipamento, sensores químicos, soluções padrão, modo de preparação de soluções e extratos usados na análise de gliadinas em amostras de papas de bebé em pó e farinhas por recurso a um sistema de multi-sensores.

### 2.5.1. Sistema de multi-sensores

O sistema de multi-sensores foi preparado numa placa de cloreto de polivinilo (PVC) por impressão, nas duas faces, de um circuito usando o método *print-screen*, por aplicação de uma pasta epoxilica condutora de prata (EPO-TK E4110, Epoxy Technology, Inc.). Em cada um dos lados do sistema é possível aplicar 10 sensores químicos, permitindo ter um sistema de multi-sensores com 20 sensores. A fase final da montagem do sistema consistiu na colocação da ficha RS-232 de 25 pinos no sistema e posterior impermeabilização do sistema, usando como revestimento uma resina acrílica (PLASTIK 70, Kontakt Chemie) adicionada por pulverização. A

Figura 2 mostra o sistema de multi-sensores preparado. Os círculos a preto são as zonas protegidas da impermeabilização e correspondem aos pontos onde os sensores foram adicionados.



**Figura 2:** Sistema de multi-sensores com 2,5 cm de largura de 9,5 cm de comprimento.

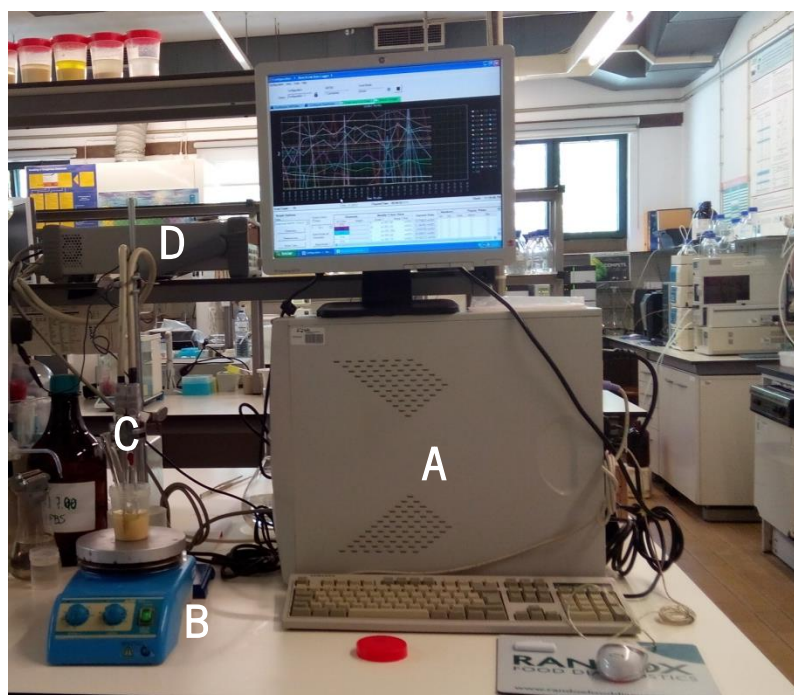
Os sensores químicos usados são membranas poliméricas de sensibilidade cruzada. As membranas resultam da combinação de vários compostos: 4 aditivos lipídicos (entre 2,8% e 3,2%), 5 plastificantes (entre 64,7% e 65,2%) e o polímero PVC (entre 31,9% e 32,3%). Como substâncias aditivas (todas da *Fluka*) foram usados: octadecilamina, álcool oleílico, cloreto de metiltrioctilamónio e ácido oleico. Como substâncias plastificantes (todas da *Fluka*) usaram-se os compostos: adipato de bis-(1-butilpentilo), sebacato de dibutilo, 2-nitrofenil octil éter, fosfato de 2-etil-hexilo e fosfonato de dioctilfenilo. Cada mistura foi obtida por pesagem de cada um dos produtos, posteriormente, dissolvidos com o solvente THF. Cada sensor foi aplicado com a técnica gota-a-gota em intervalos de tempo de 3 a 5 minutos para evaporação completa do solvente, até à formação de uma membrana polimérica transparente e de aparência cristalina. Em geral, a membrana final tem um diâmetro de 3,6 mm e espessura de 0,3 mm.

O sistema de multi-sensores foi preparado em duplicado e usado num sistema analítico potenciométrico. Este sistema analítico corresponde a uma língua eletrónica, pois em trabalhos anteriores (Meirinho, 2009; Peres et al., 2011), com os sensores usados, verificou-se que permite a distinção dos cinco sabores básicos.



### 2.5.2. Equipamento

Neste trabalho o sistema analítico potenciométrico montado era constituído por dois sistemas de multi-sensores, iguais na sua constituição ao nível dos sensores químicos, e um eletrodo de referência Ag/AgCl de dupla junção. Um datalogger da *Agilent*, controlado através do *software Agilent BenchLink Data Logger*, permitiu a aquisição do sinal de cada sensor. Todas as soluções foram analisadas sob agitação magnética (placa da *VELP Scientifica*, modelo *ARE Heating magnetic stirrer*). O esquema de montagem do equipamento encontra-se na Figura 3.



**Figura 3:** Esquema de montagem do sistema para análise com língua eletrônica.

A – Computador; B – Placa de agitação magnética; C – Sistema de multi-sensores + eletrodo de referência inserido numa amostra; D – Datalogger.

### 2.5.3. Preparação de soluções

As amostras foram preparadas usando o procedimento descrito na secção de análise de proteína total (secção 2.3.2) para as amostras (secção 2.3.2.3) e analisadas, posteriormente, por HPLC para confirmar os níveis de concentração em gliadinas.

#### 2.5.4. Análise de gliadinas por sistema de multi-sensores

A análise com o sistema analítico implica uma pré-lavagem cuidadosa dos dois sistemas de multi-sensores e do eletrodo de referência com água desionizada e secagem com papel absorvente antes de ser mergulhado na solução a analisar.

Todas as análises foram efetuadas à temperatura ambiente. Cada análise implicou um período de estabilização do sinal de 5 minutos, com agitação magnética, ao fim do qual se removeram os dois sistemas de multi-sensores e o eletrodo de referência da solução medida para os preparar para nova análise. Neste período de estabilização foi possível monitorizar continuamente os sinais de cada um dos 40 sensores.

Os perfis de sinais de potencial de cada membrana polimérica foram transferidos para o programa *Excel* para posterior tratamento de dados.

#### 2.5.5. Métodos estatísticos

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho foram tratados com o programa de estatística R, versão 2.15.1. No tratamento estatístico usaram-se os pacotes do R: *MASS* (Venables & Ripley, 2002), *subselect* (Cerdeira et al., 2015) e *caret* (Kuhn, 2015).

No estudo da eficácia da extração pelas duas soluções de extração, os níveis de proteína extraída foram analisados através do cálculo das percentagens de extração de proteína total (m/m).

Na regressão linear múltipla (Venables & Ripley, 2002; Kuhn, 2015) verificou-se a qualidade do ajuste, bem como, a sua capacidade de previsão. Na avaliação da previsão dos modelos lineares verificou-se graficamente a relação linear entre os valores previstos pelo modelo obtido por regressão linear múltipla e os esperados. Também graficamente, foi avaliada a qualidade do ajuste através da dispersão dos resíduos (com e sem normalização) em função dos valores previstos verificando-se se seguem qualquer tendência ou se têm uma distribuição aleatória; a normalidade dos resíduos, avaliando-se a distribuição dos resíduos em relação à linha definida no gráfico (representando a distribuição normal); a distância de *Cook* (valores superiores a 1, possíveis *outliers*, indicam tratar-se de dados excessivamente influentes na estimação dos coeficientes de regressão) em função da influência *Leverage* (valores abaixo de

0,2 são aceitáveis; valores entre 0,2 e 0,5 são arriscados; e, valores superiores a 0,5 indicam a presença de um *outlier* multivariado) para avaliar a presença de valores *outlier*. Na análise discriminante linear (Venables & Ripley, 2002; Kuhn, 2015) a qualidade do modelo foi avaliada em função das classificações corretas obtidas. Os modelos de regressão linear múltipla e os da análise discriminante linear foram avaliados ao nível do desempenho de previsão, por meio da validação cruzada *leave-one-out* e *K-folds*. A aplicação da validação cruzada tem como objetivo avaliar a capacidade de previsão do modelo linear, através da divisão do conjunto de dados em subconjuntos mutuamente exclusivos que são usados como dados de treino para estimar os parâmetros do modelo, exceto um conjunto (dados de teste) que é usado na validação do modelo. No caso da validação cruzada *leave-one-out*, uma matriz de dados com N ensaios permite obter N modelos onde, o grupo de teste contém um só ensaio e o grupo de treino os restantes (N-1) para definir o modelo, repetindo-se este processo até todos os ensaios terem sido usados no grupo de teste. Para a validação cruzada com *K-folds*, os N ensaios são divididos em K subgrupos e, tal como no caso anterior, um subconjunto é utilizado para teste e os K-1 restantes são utilizados para treino de forma a estimar os coeficientes do modelo, sendo o processo repetido K vezes, alternando o subconjunto de teste.

Em paralelo, usou-se o algoritmo meta-heurístico arrefecimento simulado (SA, *simulated annealing*) para seleção de variáveis independentes (subconjunto de sensores ou de comprimentos de onda). É um algoritmo que permite uma busca local probabilística seguindo um procedimento de otimização fundamentada numa analogia associada ao aquecimento a altas temperaturas de um material (metal/vidro) que sofre posterior arrefecimento lento e controlado, de forma a atingir uma estrutura cristalina de energia mínima (estrutura mais estável). A procura da energia mínima do sistema é a base da técnica de otimização onde, as diferentes configurações que são usadas (diferentes subconjuntos de variáveis independentes) correspondem a soluções diferentes para o problema da otimização (Cerdeira et al., 2015).

---

## 3. Resultados e Discussão

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo a avaliação da capacidade de um sistema de multi-sensores para discriminar papas de bebê e pó com e sem glúten. Para o efeito, foi necessário estudar o método de extração de gliadinas, bem como, os métodos de quantificação de proteína total e gliadinas de forma a estabelecer os seus níveis nos extratos das amostras de papas de bebê e farinhas (Tabela 1, Capítulo 2).

### 3.1. Método de *Bradford*

O Método de *Bradford* (MB) foi aplicado em duas matrizes diferentes, de acordo com as duas soluções de extração de gliadinas testadas neste trabalho.

No primeiro estudo de extração, usando o tampão fosfato com SDS, o MB foi aplicado usando soluções padrão de BSA diluídas nesta solução para serem comparáveis com os extratos obtidos do padrão de gliadina e das amostras. A mistura de tampão fosfato com SDS foi usada pois, como referido anteriormente, segundo o trabalho conduzido por Lambrecht et al., (2015), estas condições permitem uma extração média de  $81\pm 5\%$  em glúten para amostras de albumina bovina, ovalbumina, farinha de trigo, glúten e glicina de soja. É importante salientar que, após vários ensaios, as condições de extração reportadas nesse trabalho foram adaptadas (variação de pH e temperatura) de forma a verificar se era possível obter a percentagem de extração indicada. Os resultados dos ensaios experimentais de adaptação das condições de extração que não conduziram a resultados conclusivos, bem como os resultados obtidos para as retas de calibração de teste, encontram-se discriminados no Anexo A. É de salientar que estes ensaios foram feitos para os padrões de glúten e gliadinas.

A calibração, obtida a partir das soluções padrão de BSA (concentrações entre 21 mg/L e 700 mg/L) em tampão fosfato com SDS, está indicada na equação 3 (reta de calibração apresentada na Figura B1 do Anexo B), sendo Abs a absorvância (em unidades arbitrárias) e C a concentração (mg/L), que justifica 99,8% da variabilidade dos dados ( $R^2$ ), correspondendo a um coeficiente de correlação (R) de 0,999.

$$\text{Abs} = 3,76 \times 10^{-4} (\pm 7 \times 10^{-6}) \times C + (-5 \times 10^{-3} (\pm 3 \times 10^{-3})) \dots\dots\dots (\text{eq. 3})$$

No segundo estudo usou-se uma solução de extração hidro-etanólica contendo 80% de etanol. É de realçar que, com esta solução de extração, teve-se dificuldades em dissolver a proteína padrão, a BSA. Para garantir uma correta calibração do método foi necessário adquirir um *kit* com o MB, otimizado para a análise nestas condições. É importante salientar que foram feitos vários ensaios experimentais para otimizar o método. Os resultados dos ensaios experimentais que não conduziram a resultados conclusivos, bem como os resultados obtidos para as retas de calibração de teste, encontram-se discriminados no Anexo A. É de salientar que estes ensaios foram feitos para os padrões de glúten e gliadinas.

A calibração, obtida no intervalo de concentrações entre 125 mg/L e 1500 mg/L de BSA em solução hidro-etanólica, está indicada na equação 4 (reta de calibração apresentada na Figura B2 do Anexo B) e mostra uma tendência linear sendo o  $R^2$  igual a 0,997 ( $R=0,9986$ ).

$$\text{Abs}=6,9\times 10^{-4}(\pm 2\times 10^{-5})\times C+(-5\times 10^{-2}(\pm 2\times 10^{-2})) \dots\dots\dots(\text{eq. 4})$$

Verificou-se que o declive da reta obtida para o MB onde se usou o tampão fosfato com SDS na preparação das soluções padrão de calibração é 0,54 vezes menor que o obtido com as soluções padrão preparadas com a mistura hidro-etanólica, indicativo que nestas condições o MB é mais sensível.

### 3.2. Extração de gliadinas com solução tampão fosfato com SDS

De forma a concluir sobre o desempenho de extração de gliadinas com o tampão fosfato com SDS, efetuaram-se extrações de gliadinas usando soluções padrão de gliadina e 6 amostras de papas de bebé (3 com glúten e 3 sem glúten), cujos extratos analisados pelo MB permitiram definir os seus conteúdos em proteína total. O valor de concentração teórica, a concentração experimental em proteína total das soluções padrão de gliadina e das amostras de papas, bem como o valor da percentagem de proteína total extraída encontram-se resumidos na Tabela 3. Os valores individuais para cada uma das soluções padrão de gliadina e amostras de papas encontram-se na Tabela C1 (Anexo C).

Verificou-se que em todos os ensaios de extração realizados foi possível extrair proteína, sendo a amostra CG1 a que apresentava os valores mais baixos. A percentagem média de

proteína total extraída das soluções padrão de gliadina, obtida a partir de 6 ensaios, foi de  $37\pm 2\%$  m/m de padrão de gliadina. Este resultado vai de encontro ao que era esperado, tendo em conta que o rendimento médio de extração reportado na literatura era de  $81\pm 5\%$ , em glúten, com esta solução de extração (Lambrecht et al., 2015). Na pesquisa bibliográfica efetuada não foi encontrado qualquer outro trabalho com esta solução de extração.

Nos ensaios de extração com soluções padrão de gliadina, considerou-se que a proteína total obtida pelo MB corresponde à concentração total em gliadinas. No caso das amostras, os valores apresentados de proteína total não são indicativos de serem níveis de gliadinas, pois nas amostras com e sem glúten foram obtidos níveis semelhantes de proteína extraída, o que indica que possam estar a ser contabilizadas outras proteínas presentes nas amostras provenientes da sua composição.

**Tabela 3:** Resultados da extração de gliadinas com 10 mL de tampão fosfato com SDS de soluções padrão de gliadina e amostras de papas de bebé com (CG) e sem (SG) glúten (valores individuais apresentados no Anexo C)

Código <sup>*1</sup>	N <sup>*2</sup>	[Amostra] g/L <sup>*3</sup> Média±Desvio	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup> Média±Desvio	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup> Média±Desvio
G	6	1,11±0,08	0,41±0,03	37,13±2,12
SG1	9	1,30±0,14	0,24±0,05	18,71±2,74
SG2	9	1,20±0,13	0,16±0,04	12,98±2,79
SG3	9	1,28±0,12	0,15±0,03	11,34±1,33
CG1	9	1,12±0,09	0,05±0,02	4,17±2,10
CG2	9	1,28±0,15	0,17±0,03	13,49±2,42
CG3	9	1,26±0,19	0,15±0,04	12,39±3,39

\*1) G – gliadina; SG – sem glúten; CG – com glúten;

\*2) Número de ensaios efetuados;

\*3) Concentração média de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração média de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % média de Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

De acordo com a Tabela 1 (Capítulo 2), a amostra CG1 tem uma composição à base de farinhas de trigo, aveia, cevada, arroz, centeio e amido de milho (66%). A amostra CG2 é constituída essencialmente de farinha de trigo hidrolisada e trigo (49,2%). A amostra CG3 tem na sua composição 33% de farinha de cereais, nomeadamente arroz, aveia, trigo, cevada, painço, milho e centeio. A amostra SG1 é constituída à base de amido de milho e farinha de arroz (29%). A amostra SG2 é composta por farinha de arroz hidrolisada e arroz (49,8%). A amostra SG3 é constituída essencialmente por farinha de arroz (29%).

A amostra CG1 apresenta extratos contendo proteína total inferior a 5% (média de 9 ensaios,  $4\% \pm 2\%$ ), valores baixos considerando os obtidos nas outras 5 amostras (em média, superiores a 11%). Para as 3 amostras sem glúten obtiveram-se valores superiores a 10% (SG1,  $19\% \pm 3\%$ ; SG2,  $13\% \pm 3\%$ ; SG3,  $11\% \pm 1\%$ ; média de 9 ensaios para cada amostra), atribuindo-se este valor à extração de outras proteínas presentes na amostra provenientes da sua composição, como já foi referido anteriormente, mas sem colocar de lado a hipótese de contaminações de glúten no alimento. Segundo o artigo 6 do Regulamento de Execução N° 828/2014 da Comissão de 30 de Julho de 2014 relativo aos requisitos de prestação de informações aos consumidores sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten nos géneros alimentícios “A remoção do glúten dos cereais que o contêm apresenta dificuldades técnicas consideráveis ... sendo difícil ... produzir alimentos totalmente isentos de glúten... muitos géneros alimentícios existentes no mercado, que foram especialmente transformados para reduzir o teor de glúten ... podem conter pequenas quantidades residuais de glúten.”. As amostras com glúten CG2 e CG3 apresentam também valores semelhantes aos anteriores com valores médios de proteína extraída de  $13\% \pm 2\%$  e  $12\% \pm 3\%$ , respetivamente.

Estes resultados mostram que a extração de gliadinas com tampão fosfato com SDS não é muito seletiva ao glúten e consequentemente, às gliadinas. Adicionalmente, estes resultados também mostram que é importante efetuar a confirmação da presença de gliadinas nos extratos para a avaliação da conformidade dos rótulos nos produtos alimentares, razão pela qual se testou outro método de extração (solução hidro-etanólica).

### 3.3. Extração de gliadinas com solução hidro-etanólica

A segunda solução de extração de gliadinas testada neste trabalho foi a solução hidro-etanólica (80% de etanol) por estar referenciada como uma solução de extração bastante seletiva ao glúten (Peres et al., 2011).

De forma a concluir sobre o desempenho de extração de gliadinas com a solução hidro-etanólica, efetuaram-se extrações de gliadinas usando soluções padrão de gliadina, 12 amostras de papas de bebé (6 com glúten e 6 sem glúten) e 2 amostras de farinhas (com glúten), cujos extratos analisados pelo MB permitiram definir os seus conteúdos em proteína total. O valor de concentração teórica, a concentração experimental em proteína total das soluções padrão de



gliadina e das amostras de papas e farinhas, bem como o valor da percentagem de proteína total extraída obtidos a partir da análise pelo *kit* de MB estão resumidos na Tabela 4. Os valores individuais para cada uma das soluções padrão de gliadina, amostras de papas e farinhas encontram-se na Tabela C2 (Anexo C).

**Tabela 4:** Resultados da extração de gliadinas com 10 mL, 50 mL e 60 mL de solução hidro-etanólica de soluções padrão de gliadina, amostras de papas de bebé com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten) (valores individuais apresentados no Anexo C)

Código <sup>*1</sup>	N <sup>*2</sup>	[Amostra] g/L <sup>*3</sup> Média±Desvio	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup> Média±Desvio	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup> Média±Desvio
G	5	1,76±0,95	0,11±0,03	8,03±4,26
SG1	3	156,54±77,72	0,10±0,02	0,08±0,05
SG2	6	178,40±54,72	0,20±0,11	0,12±0,05
SG3	6	178,50±54,78	0,19±0,10	0,11±0,06
SG4	2	201,16±0,19	0,13±0,01	0,067±0,003
SG5	2	201,20±0,58	0,13±0,02	0,06±0,01
SG6	2	201,02±1,08	0,22±0,02	0,109±0,009
CG1	5	174,10±60,03	0,16±0,05	0,10±0,03
CG2	5	174,00±60,00	0,15±0,04	0,10±0,05
CG3	5	174,45±60,24	0,15±0,04	0,10±0,05
CG4	1	201,91	0,10	0,05
CG5	1	201,35	0,13	0,06
CG6	1	205,08	0,11	0,05
PD	17	74,45±68,85	0,39±0,24	0,87±0,53
P	17	58,14±58,00	0,29±0,20	1,25±1,34

\*1) G – gliadina; SG – sem glúten; CG – com glúten; PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2;

\*2) Número de ensaios efetuados;

\*3) Concentração média de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração média de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % média de Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Os resultados mostram que a solução de extração hidro-etanólica não extrai níveis de proteína elevados considerando os resultados obtidos na solução de extração tampão fosfato com SDS (secção 3.2). No entanto, estudos anteriores referem que a solução de extração hidro-etanólica permite a extração diferenciada de gliadinas e, por isso, os menores valores obtidos de percentagem de extração eram esperados. É de realçar que noutro trabalho (Peres et al., 2011), onde foi feita a análise semi-quantitativa de gliadinas em produtos alimentares, este solvente apresentou uma sensibilidade e seletividade de 70% e 64%, respetivamente. Em relação à variabilidade nos valores das percentagens de extração de proteína total (associada ao nível de glúten e, por isso, ao nível de gliadinas), esta pode dever-se à qualidade do padrão, quer nas

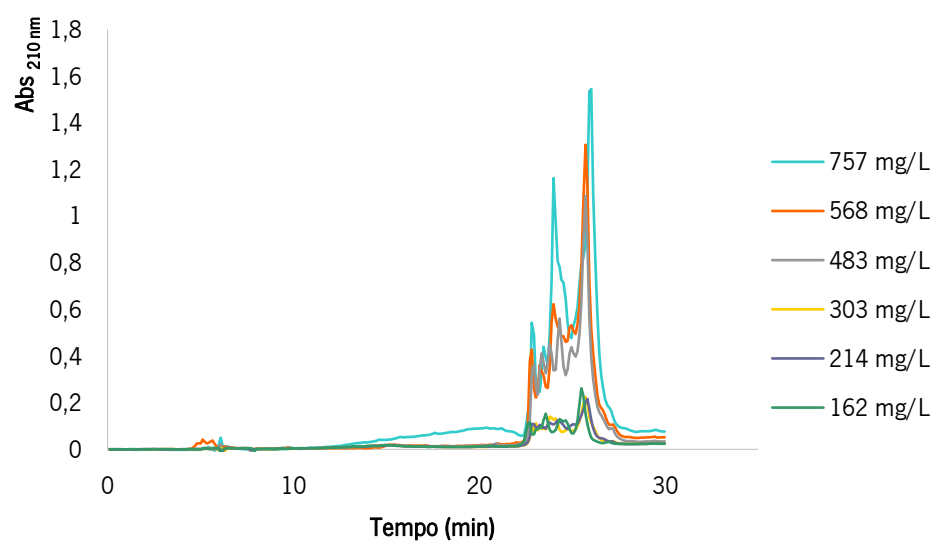
dimensões das suas partículas, quer na própria composição das suas subunidades proteicas (Daresh et al., 2014).

Neste estudo, as soluções padrão de gliadina têm níveis de proteína que correspondem à extração de 1,3% e 15,0% m/m de padrão de gliadina, que são baixos considerando que o composto usado é padrão de gliadina. Nas amostras, os valores de proteína extraídos são substancialmente mais baixos que os obtidos no estudo anterior; as amostras sem glúten mostram valores de percentagem de proteína extraída inferiores a 0,2%; as amostras com glúten, inferiores a 0,19%; as 2 farinhas usadas apresentam valores entre 0,4% e 4,4%. Estes resultados parecem indicar que, realmente, a solução de extração hidro-etanólica poderá ter alguma seletividade na extração de gliadinas, tal como evidenciado por Peres et al., (2011). Além disso, salientam também a importância de usar uma metodologia analítica para identificar a presença de gliadina nos extratos hidro-etanólicos das amostras de papas de bebé e farinhas, uma vez que todos os extratos mostram a presença de níveis de proteína total (valores variaram entre 0,04% e 15%), mesmo nas amostras sem glúten. A metodologia analítica usada para verificar a presença de gliadinas no extrato de cada amostra foi a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

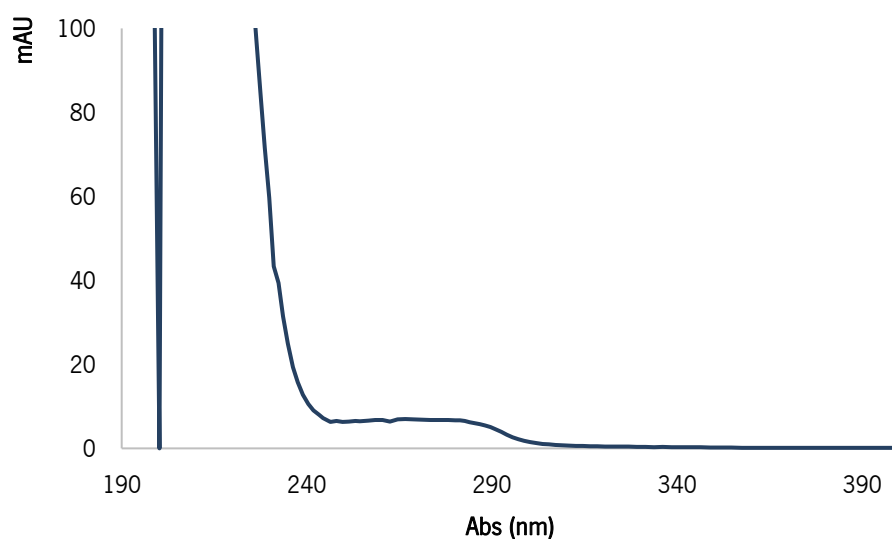
### **3.4. Análise de gliadinas em alimentos por HPLC**

Todas as papas de bebé, bem como as farinhas em estudo foram analisadas por HPLC com o intuito de verificar quais as papas/farinhas que continham gliadinas na sua composição, assim como, determinar a concentração de gliadinas nas mesmas. A calibração do sistema de HPLC foi feita a partir de soluções padrão de gliadina em que, por não se verificar uma dissolução completa das massas de padrão de gliadina usadas, se determinou as concentrações experimentais por MB, assumindo-se que a concentração em proteína total corresponde à de gliadina.

Na Figura 4 apresentam-se os perfis cromatográficos obtidos por HPLC, a 210 nm, para as soluções padrão de gliadina usadas na reta de calibração. Os cromatogramas obtidos mostram uma zona sem picos entre os tempos de retenção 10 min e 20 min, após a qual aparecem os picos de gliadina que são confirmados pelo espectro UV-Vis típico (Figura 5).



**Figura 4:** Perfis cromatográficos obtidos por HPLC, a 210 nm, para as soluções padrão de gliadina (concentrações entre 162 mg/L e 757 mg/L) usadas na reta de calibração.



**Figura 5:** Espectro UV-Vis típico para gliadina.

As áreas totais das soluções padrão de gliadina (soma das áreas dos picos identificados como gliadinas através do espectro UV-Vis) mostraram uma relação linear com as concentrações obtidas pelo MB. A calibração obtida (reta de calibração apresentada na Figura B3 do Anexo B) foi

$$A = 1,13 \times 10^6 (\pm 4,61 \times 10^4) \times C + (-1,25 \times 10^8 (\pm 2,26 \times 10^7)) \dots\dots\dots (\text{eq. 5})$$

onde, A é a área (em unidades arbitrárias) e C é a concentração de gliadina (mg/L). O modelo linear explica 99,5% da variabilidade dos dados usados na calibração, correspondendo ao coeficiente de correlação de 0,998. O valor do coeficiente de correlação é aceitável, sugerindo que os pontos apresentam tendência linear, mas com alguma dispersão.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são parâmetros relevantes na análise por HPLC, uma vez que indicam a partir de que concentração a amostra em análise pode ser detetada ou quantificada. Dado que se deu continuidade a um trabalho anterior (Meirinho, 2009) de análise de gliadinas por HPLC, usou-se o mesmo equipamento e procedimento experimental. Assim, neste estudo, assumiu-se o LD e o LQ de 46,5 mg/L e 140,9 mg/L de gliadinas (i.e. os valores obtidos nesse trabalho anterior).

Da mesma forma, na análise por HPLC das amostras de papas de bebé e farinhas resultaram cromatogramas onde cada pico de gliadina foi identificado pelo espectro UV-Vis e, posteriormente, calculada a área total dos picos de gliadina. Usando as áreas totais definidas para cada amostra calcularam-se as concentrações de gliadina através da reta de calibração definida. Os conteúdos em gliadina definidos por HPLC encontram-se resumidos na Tabela 5. Os valores individuais destes resultados encontram-se na Tabela D1 (Anexo D).

Na avaliação destes resultados teve-se em consideração que os produtos comerciais com glúten mostram níveis superiores a 100 mg/kg (implica níveis de gliadina de cerca de 50 mg/kg). Segundo a Comissão do *Codex Alimentarius*, os produtos alimentares classificados de “livres de glúten” poderão apresentar níveis de glúten entre 20 mg/kg e 100 mg/kg, sendo que, para valores inferiores a este valor mínimo são classificados de “alimentos naturalmente sem glúten” e para valores superiores ao valor máximo, correspondem a “alimentos com glúten”. Os “alimentos que contêm trigo, cevada, centeio e/ou aveia” podem ser classificados como “livres de glúten” sempre que lhes seja retirado o glúten de modo a “cumprir as necessidades dietéticas dos doentes celiacos” (Codex Alimentarius, CODEX STAN 118-1979, 2008; Comissão Europeia, 2014). Esta classificação pode ser avaliada em níveis de gliadinas considerando que estas correspondem a 50% da composição do glúten, do seguinte modo: “alimentos naturalmente sem glúten” <10 mg/kg em gliadina; alimentos “livres de glúten” entre 10 mg/kg e 50 mg/kg em gliadina e “alimentos com glúten” >50 mg/kg em gliadina.

**Tabela 5:** Resultados da análise de gliadinas por HPLC obtidos para amostras de papas de bebé com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten) extraídas em solução hidro-etanólica (valores individuais apresentados no Anexo C)

Código <sup>*1</sup>	N <sup>*2</sup>	Min-Max [Proteína Total] <sub>HPLC</sub> g/L <sup>*3</sup>	Nível de Gliadina mg/kg <sup>*4</sup> Média±Desvio
SG1	3	nd <sup>*5</sup>	nd
SG2	6	[nd; 0,117]	34,15±26,58
SG3	6	[nd; 0,114]	33,64±25,99
SG4	2	nd	nd
SG5	2	nd	nd
SG6	2	nd	nd
CG1	5	nd	nd
CG2	5	nd	nd
CG3	5	nd	nd
CG4	1	nd	nd
CG5	1	nd	nd
CG6	1	nd	nd
PD	17	[0,116; 0,380]	200,77±172,82
P	17	[nd; 0,374]	168,26±146,45

\*1) SG – sem glúten; CG – com glúten; PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2;

\*2) Número de ensaios efetuados;

\*3) Intervalo de concentrações de Proteína Total obtida, por HPLC, nos ensaios;

\*4) Nível de Gliadina obtido nos ensaios;

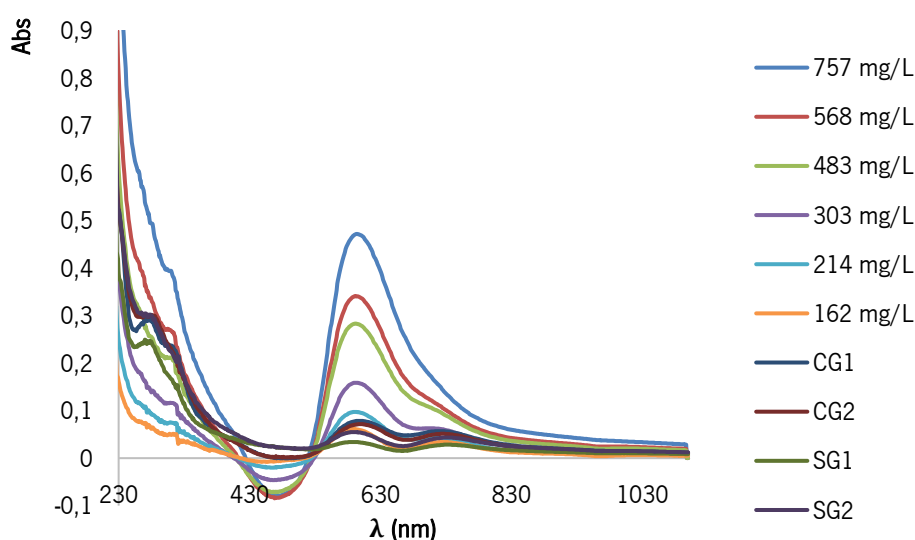
\*5) nd – não detetado.

A Tabela 5 mostra que só nas farinhas e em duas papas de bebé foram detetadas as gliadinas e que são duas amostras sem glúten (SG2 e SG3). Nestas, os níveis de gliadina são inferiores a 58 mg/kg. Nas amostras de papa de bebé com indicação no rótulo de serem amostras com glúten, não foi detetada qualquer presença de gliadina, o que pode justificar-se pelo facto de no rótulo destas amostras estar indicado que são feitas à base de farinhas integrais e hidrolisadas. Assim, segundo a classificação do *Codex Alimentarius*, neste estudo usaram-se 10 amostras de “alimentos naturalmente sem glúten” (SG1, SG4, SG5, SG6, CG1, CG2, CG3, CG4, CG5 e CG6), 2 amostras de “alimentos isentos de glúten” (SG2 e SG3) e 2 amostras de “alimentos com glúten” (PD e P).

Em geral, o conteúdo em gliadina nos extratos hidro-etanólicos varia entre 20% a 60% dos conteúdos em proteína total obtidos pelo MB.

### 3.5. Análise de gliadinas usando espectros UV-Vis

Neste estudo pretendeu-se também verificar a possibilidade de quantificação direta dos níveis de gliadinas nos extratos hidro-etanólicos por espectrofotometria UV-Vis através do MB, considerando a informação presente nos espectros UV-Vis de todas as soluções preparadas no MB. Na Figura 6 apresentam-se espectros UV-Vis típicos obtidos (190 nm-1100 nm) de soluções de extração hidro-etanólica do padrão de gliadina com concentrações diferentes (soluções padrão de calibração) e de 4 amostras com e sem glúten usando o MB.



**Figura 6:** Espectros UV-Vis das soluções hidro-etanólicas de padrão de gliadina (6 níveis de concentração: 162 a 757 mg/L) e 4 amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten usando o MB.

Tal como esperado, verificou-se que os valores máximos de absorvância são obtidos no comprimento de onda 595 nm. Os resultados mostram que a intensidade de absorção das soluções de gliadinas está dependente da concentração.

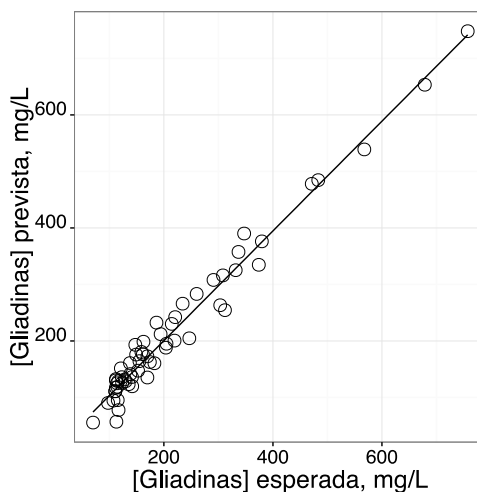
Cruzando os resultados de concentração de gliadinas obtidos para as soluções padrão de gliadinas pelo MB e para as diferentes amostras por HPLC com os respectivos espectros UV-Vis, verificou-se a possibilidade de obter um modelo de regressão linear múltipla para a determinação da concentração de gliadinas nas amostras por UV-Vis.

Para definir o possível modelo matemático de previsão, estudou-se a função de ajuste linear de estimação com os resultados de concentração de gliadinas dos ensaios efetuados: soluções padrão de gliadina, amostras de papas de bebé com e sem glúten e amostras de farinhas (com glúten). A base de dados foi reduzida aos comprimentos de onda de valores com terminação zero ou cinco e, na seleção do melhor subconjunto de variáveis (comprimentos de onda) para obter o melhor modelo de ajuste usou-se o algoritmo *simulated annealing* (programado para selecionar sub-conjuntos de 2 a 15 comprimentos de onda). A relação encontrada mostrou que é possível ajustar satisfatoriamente os dados da concentração de gliadinas aos espectros UV-Vis das soluções preparadas usando o MB. O modelo matemático obtido incluiu as absorvâncias medidas em 15 comprimentos de onda (560, 595, 610, 640, 655, 710, 735, 740, 905, 915, 930, 935, 950, 965 e 1080 nm), com um coeficiente de determinação médio de  $0,94 \pm 0,06$  na validação cruzada de 10 *K-folds*. Não se procurou um modelo de regressão linear múltipla com mais variáveis independentes (medições a outros comprimentos de onda) pois, pretendeu-se obter o modelo com o menor número de variáveis. O modelo de regressão linear múltipla apresentou coeficientes estatisticamente significativos para todos os comprimentos de onda usados (valor de  $p < 0,0007$ ) e um coeficiente de determinação, ajustado ao número de variáveis independentes usado, de 0,96. Foi verificado que os resíduos do modelo apresentavam normalidade na sua distribuição e aleatoriedade em função da ordem crescente da concentração de gliadinas (Figura E1, Anexo E). Devido ao maior número de amostras com concentrações inferiores a 400 mg/L, a maior dispersão nos resíduos encontra-se nesta zona.

Na Figura 7 mostra-se o desempenho do melhor modelo obtido ao comparar as concentrações de gliadinas previstas pelo modelo com os valores de concentração determinados por HPLC. Verificou-se que os dados da previsão das concentrações de gliadinas nas amostras são semelhantes aos valores de concentração esperados (obtidos por HPLC).

Os resultados mostraram uma relação linear com um declive de  $0,99 \pm 0,01$ , uma ordenada na origem estatisticamente não significativa, ou seja, corresponde ao valor teórico de zero e um coeficiente de determinação ajustado de 0,991 (coeficiente de correlação, 0,996). É de realçar que os resultados apresentados mostram ter-se obtido um modelo de previsão satisfatório pois, na relação linear simples (Figura 7) o declive é próximo do teórico (1), a ordenada na origem é zero e o coeficiente de correlação é também próximo do teórico (1). Esta

nova metodologia mostrou que é possível, através do MB, obter também os níveis de gliadinas nos extratos hidro-etanólicos por análise UV-Vis.



**Figura 7:** Relação entre as concentrações de gliadina previstas pelo melhor modelo de regressão linear múltipla obtido e os valores obtidos por HPLC.

O presente modelo não foi obtido só com as soluções padrão de gliadina, pois nestas soluções a concentração de gliadinas corresponde à da proteína total que é obtida através da medição da absorvância a um só comprimento de onda, a 595 nm (MB). Em trabalho futuro devem preparar-se soluções padrão de glúten para se ter concentrações diferentes de proteína total e de gliadinas e, desse modo, otimizar a simultânea análise da proteína total e gliadinas pelo MB, usando extratos hidro-etanólicos de papas de bebé e farinhas. Deverá também verificar-se se metodologias mais complexas (como por exemplo, o modelo linear por aplicação do método dos mínimos quadrados parciais ou modelo não lineares, como as redes neurais artificiais) permitem simplificar a calibração e obter melhores resultados ao nível dos erros.

### 3.6. Análise de gliadinas em alimentos por sistema de multi-sensores

A língua eletrónica aplicada foi construída com sensores selecionados, tendo por base trabalhos anteriores (Meirinho, 2009; Peres et al., 2011), e aplicada na análise de gliadinas em extratos hidro-etanólicos (80% etanol) de papas de bebé com e sem glúten e farinhas (com glúten) com o objetivo de verificar o seu desempenho na análise qualitativa e quantitativa. Os dados gerais das amostras usadas neste estudo estão apresentados na Tabela 6.



**Tabela 6:** Extratos hidro-etanólicos das amostras de papas de bebé com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten) usadas na análise de gliadinas com a língua eletrónica

Tipo <sup>*1</sup>	Amostra <sup>*2</sup>	N <sup>*3</sup>	Min-Max [Proteína Total] <sub>HPLC</sub> g/L <sup>*4</sup>
SG	SG1	1	nd <sup>*5</sup>
SG	SG2	3	[0,111; 0,112]
SG	SG3	3	[0,111; 0,112]
SG	SG4	1	nd
SG	SG5	1	nd
SG	SG6	1	nd
CG	CG1	1	nd
CG	CG2	1	nd
CG	CG3	1	nd
CG	CG4	1	nd
CG	CG5	1	nd
CG	CG6	1	nd
Farinha	PD	6	[0,116; 0,380]
Farinha	P	7	[nd; 0,374]

\*1 e 2) SG – sem glúten; CG – com glúten; PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2;

\*3) Número de ensaios efetuados;

\*4) Intervalo de concentrações de Proteína Total obtida, por HPLC, nos ensaios;

\*5) nd – não detetado.

Na análise qualitativa efetuou-se uma análise discriminante linear com o objetivo de obter um modelo que permitisse identificar as amostras com e sem gliadina. Para verificar se o modelo tem capacidade de previsão usou-se o algoritmo *simulated annealing* para selecionar o melhor sub-conjunto de sensores para a discriminação e vários procedimentos de validação cruzada, aumentando o número de amostras para o grupo de validação (*leave-one-out*, 10 grupos *K-folds* e 7 grupos *K-folds*), de forma a verificar a robustez do modelo na resposta da previsão.

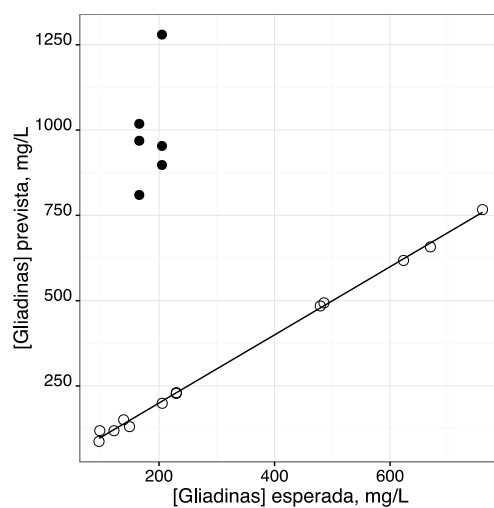
O modelo final obtido neste estudo continha 10 sensores (S1:1, S1:2, S1:4, S1:7, S1:13, S1:16, S1:17, S2:3, S2:8, S2:14). De salientar que o modelo foi obtido com 29 amostras (19 amostras com glúten e 10 amostras sem glúten), o que implica que no modelo de 10 grupos *K-folds* se dividiu as amostras em 10 grupos, cada um contendo 3 amostras, com exceção de um grupo que ficou com 2 amostras. No caso da validação cruzada com 7 grupos *K-folds*, as amostras foram divididas em 7 grupos contendo cada um 4 amostras, exceto 1 grupo com 5 amostras. O modelo contém uma só função linear que explica 100% da variabilidade encontrada na matriz dos dados. Estes resultados mostram que a língua eletrónica tem capacidade analítica

para discriminar amostras com e sem glúten em extratos hidro-etanólicos. Estes resultados já eram esperados tendo em conta um trabalho anterior (Peres, et al., 2011). O modelo de análise discriminante obtido permitiu obter 100% de classificações corretas com validação cruzada de *leave-one-out* e 10 grupos *K-folds*, e 94% de classificações corretas com validação cruzada de 7 grupos *K-folds*. O melhor modelo de análise discriminante permite a discriminação correta (100% de classificações corretas) entre amostras (farinhas e papas de bebé) com e sem glúten em extratos hidro-etanólicos (Figura F1, Anexo F).

Na análise quantitativa usaram-se as soluções de extração hidro-etanólicas das farinhas (grupo de treino) na calibração da língua eletrónica, uma vez que se usaram crescentes massas de farinha com o objetivo de ter extratos hidro-etanólicos com níveis crescentes de gliadinas. Na calibração usou-se a regressão linear múltipla com seleção de variáveis usando o algoritmo *simulated annealing* tendo-se obtido um modelo com 6 sensores: S1:5, S1:11, S2:11, S2:14, S2:16 e S2:18. O modelo apresenta um coeficiente de determinação de 0,998 (coeficiente de determinação ajustado de 0,996), que é indicativo de ser um modelo de estimação satisfatório.

A Figura 8 mostra a relação linear entre os valores previstos pelo modelo obtido e os obtidos pelo método HPLC para os dados do grupo de treino, bem como, os valores previstos para as amostras do grupo de teste. A figura mostra uma relação linear entre os valores previstos pelo modelo e os obtidos por análise HPLC nas soluções do grupo de treino, com declive próximo de 1 (0,99934), ordenada na origem com valor zero (estatisticamente o valor não é significativo no modelo obtido) e coeficiente de correlação próximo de 1 (0,9996). Em relação aos resíduos obtidos no modelo verificou-se que apresentam normalidade, mas com perda de aleatoriedade, bem como, uma amostra que pode ser um valor extremo (Figura E2, Anexo E). A previsão da concentração de gliadinas nas amostras do grupo de teste com a língua eletrónica deu resultados muito elevados em relação aos esperados, indicando que o modelo de regressão obtido (calibração com dados analíticos de farinhas) não é adequado para as papas de bebé.

Considerando estes resultados, sugere-se, em trabalho futuro, o estudo de outros métodos de calibração multivariada incluindo, a transformação dos sinais da língua eletrónica, de forma a obter calibração de melhor qualidade e desempenho na previsão.



**Figura 8:** Relação linear entre os valores de concentração de gliadinas estimados pelo algoritmo de melhoramento local restringido (MLR) obtido e os valores obtidos pelo método HPLC.

---

## 4. Conclusões

A garantia de que um produto alimentar se encontra livre de glúten é um aspeto imprescindível para os doentes celíacos, sendo de extrema importância desenvolver métodos de análise fáceis, rápidos e economicamente favoráveis que permitam a sua deteção e quantificação.

O principal objetivo deste estudo foi estabelecer a distinção entre papas de bebé em pó com glúten e sem glúten (com e sem gliadinas), tendo por base a capacidade de um sistema de multi-sensores para fornecer diferentes perfis potenciométricos consoante os diferentes conteúdos de gliadinas presentes nas amostras de papas de bebé e farinhas.

Neste estudo verificou-se que a extração usando tampão fosfato com SDS não foi muito seletiva para as gliadinas obtendo-se extratos com níveis de proteína total elevados, mesmo em amostras classificadas como “livres de glúten”. Contrariamente, os extratos hidro-etanólicos mostraram ser adequados à análise de gliadinas por espectrofotometria UV-Vis usando o método de *Bradford* (MB) e a análise multivariada com dados obtidos de multi-comprimentos de onda, revelando grande seletividade para as proteínas de gliadina.

Na análise por HPLC constatou-se que este método permite estabelecer quais os produtos alimentares com e sem gliadinas e a possível aplicação da língua eletrónica (LE). Esta última metodologia mostrou-se eficaz na separação de produtos alimentares (papas de bebé e farinhas) com e sem glúten (com e sem gliadinas) mostrando valores de seletividade e sensibilidade superiores a 95%, indicativo de uma ferramenta analítica prática, simples, rápida e barata para uma discriminação preliminar destes dois tipos de produto.

Na análise quantitativa, os resultados mostraram que é possível obter um modelo de regressão múltipla entre a concentração de gliadinas e os sinais dos sensores usados na LE. Infere-se que novos estudos de análise multivariada aos dados obtidos irão tornar possível a previsão da concentração de gliadinas nas amostras alimentares analisadas usando como padrão de calibração uma farinha com glúten.

Globalmente, para trabalho futuro recomenda-se o uso dos dados analíticos obtidos neste trabalho com novos tratamentos estatísticos multivariados para melhorar os modelos matemáticos ao nível da redução do número de variáveis independentes e do erro de previsão.

---

## Referências Bibliográficas

- Arendt, E., & Bello, F. (2008). *Gluten-Free Cereal: Products and Beverages* (1 ed.). Irlanda: ELSEVIER.
- Carreira, R. L., Silva, V. D., Lima, L. G., Morais, H. A., & Silvestre, M. P. (Outubro/Dezembro de 2011). Perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41, pp. 481-489. Obtido em Agosto de 2016, de <http://www.scielo.br/pdf/pat/v41n4/a04v41n4.pdf>
- Celiacos, A. P. (2016). *Associação Portuguesa de Celiacos*. Obtido de Associação Portuguesa de Celiacos: <http://www.celiacos.org.pt/doenca-celiaca/definicao.html>
- Cerdeira, J. O., Duarte Silva, P., Cadima, J., & Minhoto, M. (2015). Package 'subselect': Selecting Variable Subsets, R package version 0.12-5. Obtido em Junho de 2016, de <http://CRAN.R-project.org/package=subselect>
- Codex Alimentarius, CODEX STAN 118-1979*. (2008). FAO & OMS.
- Comissão Europeia. (2014). Regulamento de Execução (UE) N° 828/2014 da Comissão de 30 de julho de 2014, Relativo aos requisitos de prestação de informações aos consumidores sobre a ausência ou a presença de glúten nos géneros alimentícios. Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia.
- Dahesh, M., Banc, A., Duri, A., Morel, M. H., & Ramos, L. (2014). Polymeric Assembly of Gluten Proteins in an Aqueous Ethanol Solvent. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118, 11065-11076.
- Dias, L. A., Peres, A. M., Veloso, A. C., Reis, F. S., Vilas-Boas, M., & Machado, A. S. (2009). An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136, pp. 209-217.
- Dias, L. A., Peres, A. M., Vilas-Boas, M., Rocha, M. A., Estevinho, L., & Machado, A. S. (2008). An electronic tongue for honey classification. *Microchimica Acta*, 163, pp. 97-102.
- Dias, L. G., Peres, A. M., Barcelos, T. P., Morais, J. S., & Machado, A. S. (2011). Semi-quantitative and quantitative analysis of soft drinks using an electronic tongue. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 154, pp. 111-118.
- Dias, M. S. (2013). *Língua eletrônica potenciométrica: uma ferramenta para análise da qualidade do mel*. Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica.

- Ermer, J., & Miller, J. (2005). *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., & Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 142, pp. 135-143.
- Gallagher, E. (2009). *Gluten-Free Food Science and Technology*. Irlanda: Wiley-Blackwell.
- Kuhn, M. (2015). Package 'caret': Classification and Regression Training, R package version 6.0-52. Obtido em Junho de 2016, de <http://CRAN.R-project.org/package=caret>
- Lambrecht, M. A., Rombouts, I., Kelst, L. V., & Delcour, J. A. (2015). Impact of extraction and elution media on non-size effects in size exclusion chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*, 1415, 100-107.
- Máñez, R. M., Soto, J., Breijo, E. G., Gil, L., Ibáñez, J., & Llobet, E. (2005). An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 104, pp. 302-307.
- Meirinho, S. G. (2009). *Aplicação de um sistema de multi-sensores para a detecção de gliadinas: discriminação semi-quantitativa entre alimentos com glúten e sem glúten*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária.
- Peres, A. M., Dias, L. G., Veloso, A. C., Meirinho, S. G., Morais, J. S., & Machado, A. S. (2011). An electronic tongue for gliadins semi-quantitative detection in foodstuffs. *Talanta*, 83, 857-864.
- Pité, M. (Novembro de 2008). Glúten na Indústria Alimentar. *Qualidade e Segurança Alimentar*, 5, pp. 34-36.
- Ribani, M., Bottoli, C., Collins, C., Jardim, I., & Melo, L. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, pp. 771-780.
- Scheuer, P. M., Francisco, A., Miranda, M. Z., & Limberger, V. M. (2011). Trigo: Características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 13, pp. 211-222. Obtido em Fevereiro de 2016, de <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev132/Art13211.pdf>
- Tiwari, K., Tudu, B., Bandyopadhyay, R., & Chatterjee, A. (2013). Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue. *Journal of Food Engineering*, 117, pp. 205-210.
- Toko, K. (2000). Taste sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 64, pp. 205-215.
- Ulloa, P. A., Guerra, R., Cavaco, A. M., Costa, A. R., Figueira, A. C., & Brigas, A. F. (2013). Determination of the botanical origin of honey by sensor fusion of impedance e-tongue and optical spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 94, pp. 1-11.

- Vaz, C. A. (2 de Março de 2009). Autoanticorpos - Doenças autoimunes. Obtido em Agosto de 2016, de <http://www.laboratoriopioledo.pt/artigos/index.php?action=getDetalhe&id=2>
- Venables, W. N., & Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S* (4 ed.). New York: Springer.
- Vlasov, Y., Legin, A., Rudnitskaya, A., Di Natale, C., & D'Amico, A. (2005). Nonspecific Sensor Arrays ("electronic tongue") for Chemical Analysis of Liquids. *Pure and Applied Chemistry*, 77, pp. 1965-1983.
- Wei, Z., Wang, J., & Liao, W. (2010). Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer. *Journal of Food Engineering*, 96, pp. 469-479.
- Zakaria, A.; Shakaff, A.Y. Md; Masnan, M. J.; Ahmad, M. N.; Adom, A. H.; Jaafar, M. N.; Ghani, S. A.; Abdullah, A. H.; Aziz, A.H. A.; Kamarudin, L. M.; Subari, N.; Fikri, N. A. (2011). A Biomimetic Sensor for the Classification of Honeys of Different Floral Origin and Detection of Adulteration. *Sensors*, 11, pp. 7799-7822.





# Anexos

## **Anexo A: Resultados dos ensaios experimentais de teste**

## Anexo A1: Dados das retas de calibração usadas nos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB

Na Tabela A1 encontram-se os resultados para o declive, a ordenada na origem e respetivos erros para as retas de calibração de teste usadas nos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB, obtidos na extração com diferentes soluções de extração.

**Tabela A1:** Resultados para o declive, ordenada na origem e respetivos erros para as retas de calibração com soluções padrão de BSA preparadas com diferentes soluções de extração

Solução de extração	Condições <sup>*1</sup>	Min-Max [BSA] mg/L <sup>*2</sup>	a <sup>*3</sup>	e <sub>a</sub> <sup>*4</sup>	b <sup>*5</sup>	e <sub>b</sub> <sup>*6</sup>	R <sup>2</sup> <sup>*7</sup>
Água desionizada	Tamb	[48; 480]	$8,60 \times 10^{-04}$	$3,37 \times 10^{-05}$	$8,51 \times 10^{-03}$	$9,83 \times 10^{-03}$	0,9955
Água desionizada	Tamb	[52; 520]	$6,94 \times 10^{-04}$	$2,40 \times 10^{-05}$	$-6,51 \times 10^{-03}$	$7,57 \times 10^{-03}$	0,9952
Água desionizada	Tamb	[104; 520]	$6,54 \times 10^{-04}$	$2,29 \times 10^{-05}$	$-3,99 \times 10^{-02}$	$7,90 \times 10^{-03}$	0,9963
Água desionizada	Tamb	[50,8; 508]	$-2,16 \times 10^{-03}$	$1,25 \times 10^{-03}$	$1,38 \times 10^{+00}$	$3,87 \times 10^{-01}$	0,4247
Água desionizada	Tamb	[50,8; 508]	$6,75 \times 10^{-04}$	$7,98 \times 10^{-05}$	$-1,85 \times 10^{-02}$	$1,87 \times 10^{-02}$	0,9728
Água desionizada	Tamb	[50,4; 504]	$6,62 \times 10^{-04}$	$6,27 \times 10^{-06}$	$9,04 \times 10^{-03}$	$1,92 \times 10^{-03}$	0,9996
Água desionizada	Tamb	[50,4; 504]	$6,66 \times 10^{-04}$	$1,65 \times 10^{-05}$	$4,36 \times 10^{-03}$	$5,05 \times 10^{-03}$	0,9982
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[50; 500]	$-4,32 \times 10^{-05}$	$6,05 \times 10^{-05}$	$3,23 \times 10^{-01}$	$1,84 \times 10^{-02}$	0,1127
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[50; 500]	$-1,26 \times 10^{-05}$	$1,62 \times 10^{-05}$	$3,11 \times 10^{-01}$	$4,93 \times 10^{-03}$	0,1314
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[50,4; 504]	$-1,81 \times 10^{-04}$	$8,21 \times 10^{-05}$	$1,08 \times 10^{+00}$	$2,51 \times 10^{-02}$	0,5475

\*1) Condições de pH e temperatura;

\*2) Intervalo de concentração de BSA usada nos ensaios;

\*3) Declive;

\*4) Erro do declive;

\*5) Ordenada na origem;

\*6) Erro da ordenada na origem;

\*7) Coeficiente de determinação.

Tabela A1 (continuação)

Solução de extração	Condições <sup>*1</sup>	Min-Max [BSA] mg/L <sup>*2</sup>	a <sup>*3</sup>	e <sub>a</sub> <sup>*4</sup>	b <sup>*5</sup>	e <sub>b</sub> <sup>*6</sup>	R <sup>2</sup> <sup>*7</sup>
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[50,4; 504]	$-7,14 \times 10^{-05}$	$1,40 \times 10^{-05}$	$-5,26 \times 10^{-02}$	$4,29 \times 10^{-03}$	0,8665
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[50,4; 504]	$3,30 \times 10^{-03}$	$8,65 \times 10^{-04}$	$-1,50 \times 10^{-00}$	$2,65 \times 10^{-01}$	0,7843
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[100,8; 504]	$3,05 \times 10^{-05}$	$6,50 \times 10^{-05}$	$2,15 \times 10^{-02}$	$1,79 \times 10^{-02}$	0,0993
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[53; 530]	$-7,39 \times 10^{-06}$	$2,24 \times 10^{-05}$	$-6,50 \times 10^{-04}$	$7,20 \times 10^{-03}$	0,0265
Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	[40; 400]	$1,23 \times 10^{-04}$	$1,12 \times 10^{-05}$	$8,01 \times 10^{-03}$	$2,93 \times 10^{-03}$	0,9758
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb	[21,6; 720]	$3,84 \times 10^{-04}$	$9,25 \times 10^{-06}$	$-9,18 \times 10^{-04}$	$3,44 \times 10^{-03}$	0,9954
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	[25,5; 850]	$3,64 \times 10^{-04}$	$6,44 \times 10^{-06}$	$1,32 \times 10^{-02}$	$2,34 \times 10^{-03}$	0,9981
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	[21,3; 710]	$4,49 \times 10^{-04}$	$7,29 \times 10^{-06}$	$4,11 \times 10^{-03}$	$2,67 \times 10^{-03}$	0,9979
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	[40,5; 810]	$3,81 \times 10^{-04}$	$6,86 \times 10^{-06}$	$-8,12 \times 10^{-03}$	$3,02 \times 10^{-03}$	0,9977
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH4	[34; 578]	$3,83 \times 10^{-04}$	$4,83 \times 10^{-06}$	$-3,26 \times 10^{-03}$	$1,50 \times 10^{-03}$	0,9990
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C e 45 °C; pH4	[21,3; 710]	$3,41 \times 10^{-04}$	$4,18 \times 10^{-06}$	$-1,63 \times 10^{-03}$	$1,53 \times 10^{-03}$	0,9988
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C e 45 °C; pH4	[24,9; 830]	$3,63 \times 10^{-04}$	$8,03 \times 10^{-06}$	$5,58 \times 10^{-03}$	$3,44 \times 10^{-03}$	0,9961
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C e 45 °C; pH4	[21,3; 710]	$4,52 \times 10^{-04}$	$1,02 \times 10^{-05}$	$1,08 \times 10^{-02}$	$3,73 \times 10^{-03}$	0,9964
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH6	[23,1; 770]	$3,26 \times 10^{-04}$	$3,45 \times 10^{-06}$	$-1,08 \times 10^{-03}$	$1,37 \times 10^{-03}$	0,9991
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH8	[21,3; 710]	$3,42 \times 10^{-04}$	$1,55 \times 10^{-05}$	$-1,40 \times 10^{-02}$	$5,11 \times 10^{-03}$	0,9858
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C, 45 °C e 49 °C; pH8	[22,2; 740]	$3,57 \times 10^{-04}$	$6,80 \times 10^{-06}$	$-7,12 \times 10^{-03}$	$2,60 \times 10^{-03}$	0,9971
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C, 45 °C e 49 °C; pH8	[22,8; 760]	$3,39 \times 10^{-04}$	$7,63 \times 10^{-06}$	$3,55 \times 10^{-03}$	$2,85 \times 10^{-03}$	0,9965
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C, 45 °C e 49 °C; pH8	[78; 780]	$3,89 \times 10^{-04}$	$1,07 \times 10^{-05}$	$1,09 \times 10^{-02}$	$5,14 \times 10^{-03}$	0,9962
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH9	[158; 790]	$4,06 \times 10^{-04}$	$7,81 \times 10^{-06}$	$-3,28 \times 10^{-02}$	$4,10 \times 10^{-03}$	0,9985
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH10	[21,9; 730]	$3,02 \times 10^{-04}$	$5,24 \times 10^{-06}$	$-5,45 \times 10^{-03}$	$1,88 \times 10^{-03}$	0,9979
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH10	[25,2; 714]	$3,72 \times 10^{-04}$	$4,98 \times 10^{-06}$	$-5,63 \times 10^{-03}$	$1,80 \times 10^{-03}$	0,9987

\*1) Condições de pH e temperatura;

\*2) Intervalo de concentração de BSA usada nos ensaios;

\*3) Declive;

\*4) Erro do declive;

\*5) Ordenada na origem;

\*6) Erro da ordenada na origem;

\*7) Coeficiente de determinação.

Tabela A1 (continuação)

Solução de extração	Condições <sup>*1</sup>	Min-Max [BSA] mg/L <sup>*2</sup>	a <sup>*3</sup>	e <sub>a</sub> <sup>*4</sup>	b <sup>*5</sup>	e <sub>b</sub> <sup>*6</sup>	R <sup>2</sup> <sup>*7</sup>
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH12	[36,5; 511]	$3,94 \times 10^{-04}$	$9,32 \times 10^{-06}$	$-1,12 \times 10^{-02}$	$2,69 \times 10^{-03}$	0,9978
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	[73; 730]	$2,88 \times 10^{-04}$	$9,13 \times 10^{-06}$	$9,36 \times 10^{-03}$	$3,72 \times 10^{-03}$	0,9960
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	[24,3; 810]	$4,05 \times 10^{-04}$	$7,83 \times 10^{-06}$	$6,38 \times 10^{-03}$	$3,27 \times 10^{-03}$	0,9970
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C e 45 °C; pH12	[22,2; 740]	$3,98 \times 10^{-04}$	$8,24 \times 10^{-06}$	$1,23 \times 10^{-02}$	$3,13 \times 10^{-03}$	0,9970
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C e 45 °C; pH12	[20,7; 690]	$5,25 \times 10^{-04}$	$5,93 \times 10^{-06}$	$6,46 \times 10^{-03}$	$2,11 \times 10^{-03}$	0,9990
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C e 45 °C; pH12	[40; 680]	$3,67 \times 10^{-04}$	$8,66 \times 10^{-06}$	$4,18 \times 10^{-04}$	$3,16 \times 10^{-03}$	0,9967
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	[23,4; 780]	$4,05 \times 10^{-04}$	$5,53 \times 10^{-06}$	$1,01 \times 10^{-02}$	$2,31 \times 10^{-03}$	0,9987
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	[21,9; 620,5]	$4,04 \times 10^{-04}$	$1,34 \times 10^{-05}$	$1,22 \times 10^{-02}$	$3,75 \times 10^{-03}$	0,9935
Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	[22,2; 740]	$4,29 \times 10^{-04}$	$7,07 \times 10^{-06}$	$3,30 \times 10^{-03}$	$2,99 \times 10^{-03}$	0,9984
Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	[53; 530]	$2,74 \times 10^{-04}$	$1,51 \times 10^{-05}$	$-7,70 \times 10^{-01}$	$4,84 \times 10^{-03}$	0,9880
Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	[750; 2000]	$2,35 \times 10^{-04}$	$4,76 \times 10^{-05}$	$-1,48 \times 10^{-01}$	$7,17 \times 10^{-02}$	0,9605
Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	[25; 2000]	$1,69 \times 10^{-04}$	$6,34 \times 10^{-06}$	$7,28 \times 10^{-02}$	$6,78 \times 10^{-03}$	0,9972
Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	[125; 2000]	$5,64 \times 10^{-04}$	$3,54 \times 10^{-05}$	$-3,93 \times 10^{-02}$	$4,62 \times 10^{-02}$	0,9922

\*1) Condições de pH e temperatura;

\*2) Intervalo de concentração de BSA usada nos ensaios;

\*3) Declive;

\*4) Erro do declive;

\*5) Ordenada na origem;

\*6) Erro da ordenada na origem;

\*7) Coeficiente de determinação.

## Anexo A2: Resultados dos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB para soluções padrão

Na Tabela A2 encontram-se os resultados dos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas, pelo MB, para soluções padrão de glúten e soluções padrão de gliadina, obtidos na extração com diferentes soluções de extração.

**Tabela A2:** Resultados da extração de gliadinas com diferentes soluções de extração de soluções padrão de glúten e soluções padrão de gliadina

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	GI	Água desionizada	Tamb	0,0110	50	0,22	0,02	9,36
Padrão	GI	Água desionizada	Tamb	0,0300	50	0,60	0,04	6,88
Padrão	GI	Água desionizada	Tamb	0,0640	50	1,28	0,06	4,95
Padrão	GI	Água desionizada	Tamb	0,0930	50	1,86	0,09	4,67
Padrão	GI	Água desionizada	Tamb	0,1200	50	2,40	0,10	4,27
Padrão	GI	Água desionizada	Tamb	0,1520	50	3,04	0,13	4,15
Padrão	GI1.1	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0049	25	0,20	0,96	488,44
Padrão	GI2.1	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0165	25	0,66	-0,13	-19,26
Padrão	GI3.1	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0305	25	1,22	-0,27	-22,19
Padrão	GI4.1	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0452	25	1,81	-0,29	-16,00
Padrão	GI5.1	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0599	25	2,40	-0,16	-6,66
Padrão	GI6.1	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0749	25	3,00	-0,18	-6,10
Padrão	GI1.2	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0049	25	0,20	2,32	1182,55
Padrão	GI2.2	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0165	25	0,66	-1,39	-210,49

\*1) GI - glúten;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	GI3.2	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0305	25	1,22	-1,88	-154,13
Padrão	GI4.2	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0452	25	1,81	-1,94	-107,51
Padrão	GI5.2	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0599	25	2,40	-1,50	-62,61
Padrão	GI6.2	Tampão fosfato com 2% de SDS	Tamb	0,0749	25	3,00	-1,58	-52,71
Padrão	GI1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,1121	10	0,011	0,63	5,65
Padrão	GI2	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0940	10	0,009	0,58	6,17
Padrão	GI3	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0807	10	0,008	0,50	6,24
Padrão	GI4	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0701	10	0,007	0,45	6,48
Padrão	GI5	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0616	10	0,006	0,42	6,77
Padrão	GI6	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0508	10	0,005	0,35	6,96
Padrão	GI7	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0406	10	0,004	0,29	7,22
Padrão	GI8	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0316	10	0,003	0,24	7,48
Padrão	GI9	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0227	10	0,002	0,18	7,84
Padrão	GI10	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0111	10	0,001	0,11	10,18
Padrão	GI1.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,1129	10	0,011	0,71	6,28
Padrão	GI2.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0988	10	0,010	0,64	6,51
Padrão	GI3.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0841	10	0,008	0,57	6,79
Padrão	GI4.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0761	10	0,008	0,49	6,44
Padrão	GI5.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0670	10	0,007	0,45	6,78
Padrão	GI6.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0523	10	0,005	0,40	7,61
Padrão	GI7.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0406	10	0,004	0,35	8,52
Padrão	GI8.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0308	10	0,003	0,27	8,82

\*1) GI - glúten;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.



Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	GI9.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0238	10	0,002	0,17	10,43
Padrão	GI10.1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0163	10	0,002	0,17	10,43
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb	0,0059	25	0,24	0,05	22,55
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb	0,0111	25	0,44	0,16	36,95
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb	0,0149	25	0,60	0,13	21,19
Padrão	G4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb	0,0222	25	0,89	0,15	17,33
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0117	25	0,47	0,10	20,89
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0106	25	0,42	0,07	15,86
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0163	25	0,65	0,08	12,01
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0106	25	0,42	0,03	7,28
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0161	25	0,64	0,11	16,85
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0157	25	0,63	0,08	11,96
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0138	25	0,55	0,16	28,62
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0145	25	0,58	0,20	34,23
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH2,3	0,0125	25	0,50	0,13	25,43
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH4	0,0055	25	0,22	0,01	5,99
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH4	0,0123	25	0,49	0,04	7,90
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH4	0,0158	25	0,63	0,06	9,63
Padrão	G4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH4	0,0238	25	0,95	0,07	7,32
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0114	25	0,46	0,04	9,17
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0105	25	0,42	0,06	14,51
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0164	25	0,66	0,01	1,29
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0136	25	0,54	-0,03	-5,76

\*1) GI - glúten; G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0113	25	0,45	2,62	579,74
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0100	25	0,40	2,58	644,25
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0155	25	0,62	0,05	7,39
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0115	25	0,46	0,07	14,52
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH4	0,0106	25	0,42	0,05	11,21
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0105	25	0,42	0,05	12,28
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0161	25	0,64	0,04	6,55
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0106	25	0,42	0,03	7,93
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0142	25	0,57	0,07	12,64
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0140	25	0,56	0,12	21,17
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0166	25	0,66	0,14	20,71
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0148	25	0,59	0,17	28,24
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0117	25	0,47	0,23	48,45
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH4	0,0122	25	0,49	0,17	35,39
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH6	0,0059	25	0,24	0,03	13,64
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH6	0,0110	25	0,44	0,08	17,93
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH6	0,0162	25	0,65	0,04	6,94
Padrão	G4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH6	0,0247	25	0,99	0,16	16,39
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH8	0,0059	25	0,24	0,06	24,69
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH8	0,0117	25	0,47	0,21	44,26
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH8	0,0173	25	0,69	0,12	16,96
Padrão	G4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH8	0,0237	25	0,95	0,19	20,21
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0151	25	0,60	0,05	9,05

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0112	25	0,45	0,04	8,11
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0131	25	0,52	0,07	13,99
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0145	25	0,58	0,08	13,40
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0101	25	0,40	0,003	0,82
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0113	25	0,45	0,02	4,60
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0149	25	0,60	0,07	11,91
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0140	25	0,56	0,10	18,27
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	20 °C; pH8	0,0143	25	0,57	0,14	23,84
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0138	25	0,55	0,17	31,52
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0115	25	0,46	0,15	31,59
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0110	25	0,44	0,17	39,51
Padrão	G1.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0134	25	0,54	0,18	32,70
Padrão	G2.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0102	25	0,41	0,18	42,96
Padrão	G3.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0193	25	0,77	0,20	25,36
Padrão	G1.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0103	25	0,41	0,11	25,54
Padrão	G2.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0122	25	0,49	0,09	19,27
Padrão	G3.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0158	25	0,63	0,10	16,10
Padrão	G1.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0106	25	0,42	0,08	18,90
Padrão	G2.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0129	25	0,52	0,10	18,97
Padrão	G3.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0161	25	0,64	2,13	331,37
Padrão	G1.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0104	25	0,42	2,04	491,54
Padrão	G2.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0112	25	0,45	2,04	454,70
Padrão	G3.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0152	25	0,61	2,06	338,70

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G1.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0123	25	0,49	0,20	40,70
Padrão	G2.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0116	25	0,46	0,17	37,10
Padrão	G3.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0104	25	0,42	0,16	38,19
Padrão	G1.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0142	25	0,57	0,12	20,93
Padrão	G2.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0137	25	0,55	0,06	11,03
Padrão	G3.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0105	25	0,42	0,04	10,59
Padrão	G1.7	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0113	25	0,45	0,09	18,95
Padrão	G2.7	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0133	25	0,53	0,06	11,30
Padrão	G3.7	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0103	25	0,41	0,06	15,52
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0124	25	0,50	0,07	13,42
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0127	25	0,51	0,11	20,82
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0108	25	0,43	0,11	24,92
Padrão	G1.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0102	25	0,41	0,14	33,93
Padrão	G2.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0146	25	0,58	0,15	26,32
Padrão	G3.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0129	25	0,52	0,08	15,86
Padrão	G1.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0152	25	0,61	0,15	24,85
Padrão	G2.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0126	25	0,50	0,13	25,52
Padrão	G3.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0107	25	0,43	0,13	31,14
Padrão	G1.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0106	25	0,42	0,06	13,28
Padrão	G2.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0113	25	0,45	0,06	12,46
Padrão	G3.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0126	25	0,50	0,13	25,29
Padrão	G1.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0100	25	0,40	0,17	43,69
Padrão	G2.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0105	25	0,42	0,14	33,28

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G3.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0113	25	0,45	0,17	37,95
Padrão	G1.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0100	25	0,40	0,15	37,23
Padrão	G2.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0152	25	0,61	0,16	25,96
Padrão	G3.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0136	25	0,54	0,13	24,50
Padrão	G1.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0125	25	0,50	0,09	17,45
Padrão	G2.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0114	25	0,46	0,10	21,97
Padrão	G3.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0151	25	0,60	0,11	18,13
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0116	25	0,46	0,14	30,70
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0143	25	0,57	0,14	24,32
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0144	25	0,58	0,17	28,70
Padrão	G1.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0151	25	0,60	0,17	27,46
Padrão	G2.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0128	25	0,51	0,14	27,08
Padrão	G3.1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0172	25	0,69	0,20	29,59
Padrão	G1.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0133	25	0,53	0,14	26,75
Padrão	G2.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0142	25	0,57	0,10	18,33
Padrão	G3.2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0138	25	0,55	0,16	28,74
Padrão	G1.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0102	25	0,41	0,04	9,64
Padrão	G2.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0114	25	0,46	0,04	8,62
Padrão	G3.3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0146	25	0,58	0,05	7,97
Padrão	G1.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0114	25	0,46	0,11	24,37
Padrão	G2.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0113	25	0,45	0,08	17,27
Padrão	G3.4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0147	25	0,59	0,08	14,04
Padrão	G1.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0149	25	0,60	0,11	18,93

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G2.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0132	25	0,53	0,08	15,78
Padrão	G3.5	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0171	25	0,68	0,12	16,97
Padrão	G1.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0151	25	0,60	0,14	23,59
Padrão	G2.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0163	25	0,65	0,14	21,33
Padrão	G3.6	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH8	0,0122	25	0,49	0,17	33,88
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0148	25	0,59	0,19	31,84
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0104	25	0,42	0,07	16,17
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0159	25	0,64	0,13	20,41
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0147	25	0,59	0,17	28,79
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0110	25	0,44	0,10	21,65
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0131	25	0,52	0,02	3,05
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0107	25	0,43	0,08	17,65
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0151	25	0,60	0,13	21,79
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	49 °C; pH8	0,0146	25	0,58	0,19	32,38
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH9	0,0075	25	0,30	0,19	63,97
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH9	0,0113	25	0,45	0,18	39,84
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH9	0,0156	25	0,62	0,23	37,43
Padrão	G4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH9	0,0248	25	0,99	0,37	37,66
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH10	0,0068	25	0,27	0,17	61,87
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH10	0,0114	25	0,46	0,15	32,35
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH10	0,0162	25	0,65	0,22	34,02
Padrão	G4	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH10	0,0207	25	0,83	0,41	49,97
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH10	0,0099	25	0,40	0,16	40,06

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH10	0,0163	25	0,65	0,24	37,51
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH10	0,0201	25	0,80	0,21	25,63
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH12	0,0099	25	0,40	0,13	33,62
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH12	0,0153	25	0,61	0,27	44,86
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	Tamb; pH12	0,0213	25	0,85	0,32	37,18
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0124	25	0,50	0,15	31,23
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0118	25	0,47	0,12	25,51
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0101	25	0,40	0,08	20,62
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0121	25	0,48	-0,13	-27,69
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0100	25	0,40	-1,46	-364,31
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0101	25	0,40	-1,45	-360,03
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0126	25	0,50	0,24	48,34
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0125	25	0,50	0,28	56,34
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	25 °C; pH12	0,0133	25	0,53	0,26	49,01
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0098	25	0,39	0,09	23,18
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0152	25	0,61	0,31	51,28
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0213	25	0,85	0,46	53,78
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0160	25	0,64	0,25	39,06
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0131	25	0,52	0,22	41,83
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0143	25	0,57	0,22	37,87
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0131	25	0,52	0,23	43,29
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0126	25	0,50	0,24	47,19
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0162	25	0,65	0,26	40,49

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0101	25	0,40	0,12	28,93
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0135	25	0,54	1,23	227,88
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0107	25	0,43	1,18	275,65
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0106	25	0,42	0,11	27,11
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0138	25	0,55	0,14	26,10
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0144	25	0,58	0,15	26,42
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0118	25	0,47	0,16	33,70
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0165	25	0,66	0,06	9,77
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	45 °C; pH12	0,0132	25	0,53	0,11	20,57
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0177	25	0,71	0,17	23,99
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0141	25	0,56	0,11	19,70
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0107	25	0,43	0,07	17,32
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0120	25	0,48	0,14	29,36
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0108	25	0,43	0,16	36,54
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0107	25	0,43	0,07	17,23
Padrão	G1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0158	25	0,63	0,21	33,62
Padrão	G2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0138	25	0,55	0,17	31,11
Padrão	G3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	35 °C; pH13,6	0,0114	25	0,46	0,14	29,70
Padrão	G1	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0020	10	0,00020	0,06	31,99
Padrão	G2	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0013	10	0,00013	0,04	34,18
Padrão	G3	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0008	10	0,00008	0,04	51,86
Padrão	G4	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0005	10	0,00005	0,05	92,80
Padrão	G5	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0003	10	0,00003	0,05	161,21

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.



Tabela A2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão	G6	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0057	10	0,00057	0,11	18,85
Padrão	G7	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0046	10	0,00046	0,11	23,48
Padrão	G8	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0023	10	0,00023	0,10	41,47
Padrão	G9	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0021	10	0,00021	0,11	50,10
Padrão	G10	Etanol-Água (80%-20%)	Tamb	0,0010	10	0,00010	0,09	94,49

\*1) G – gliadina;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

### Anexo A3: Resultados dos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas pelo MB para misturas de amostras com padrão

Na Tabela A3 encontram-se os resultados dos ensaios experimentais de teste da extração de gliadinas, pelo MB, para misturas de amostras papas de bebê com padrão de gliadina, obtidos na extração com o tampão fosfato com SDS.

**Tabela A3:** Resultados da extração de gliadinas com 10 mL de tampão fosfato com SDS de misturas de amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten com padrão de gliadina

Mistura	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m(gliadina) <sub>medida</sub> , g	m(amostra) <sub>medida</sub> , g	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão+Amostra	G+SG1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0123	0,0116	2,39	0,69	28,92
Padrão+Amostra	G+SG1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0143	0,0138	2,81	0,78	27,85
Padrão+Amostra	G+SG1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0154	0,0148	3,02	0,75	24,95
Padrão+Amostra	G+SG2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0150	0,0134	2,84	0,73	25,72
Padrão+Amostra	G+SG2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0117	0,0101	2,18	0,62	28,24
Padrão+Amostra	G+SG2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0126	0,0152	2,78	0,68	24,57
Padrão+Amostra	G+SG3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0146	0,0151	2,97	0,75	25,29
Padrão+Amostra	G+SG3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0136	0,0149	2,85	0,69	24,26
Padrão+Amostra	G+SG3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0125	0,0124	2,49	0,62	25,07
Padrão+Amostra	G+CG1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0154	0,0140	2,94	0,54	18,48
Padrão+Amostra	G+CG1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0116	0,0114	2,30	0,44	19,00
Padrão+Amostra	G+CG1	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0105	0,0106	2,11	0,43	20,57

\*1) G - gliadina; SG – sem glúten; CG – com glúten;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela A3 (continuação)

Mistura	Código <sup>*1</sup>	Solução de extração	Condições <sup>*2</sup>	m(gliadina) <sub>medida</sub> , g	m(amostra) <sub>medida</sub> , g	[Amostra] g/L <sup>*3</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*4</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*5</sup>
Padrão+Amostra	G+CG2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0140	0,0136	2,76	0,71	25,77
Padrão+Amostra	G+CG2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0162	0,0141	3,03	0,79	25,95
Padrão+Amostra	G+CG2	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0127	0,0115	2,42	0,70	28,96
Padrão+Amostra	G+CG3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0123	0,0136	2,59	0,58	22,27
Padrão+Amostra	G+CG3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0110	0,0134	2,44	0,56	22,81
Padrão+Amostra	G+CG3	Tampão fosfato com 0,1% de SDS	40 °C; pH12	0,0110	0,0147	2,57	0,60	23,42

\*1) G - gliadina; CG – com glúten;

\*2) Condições de pH e temperatura;

\*3) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

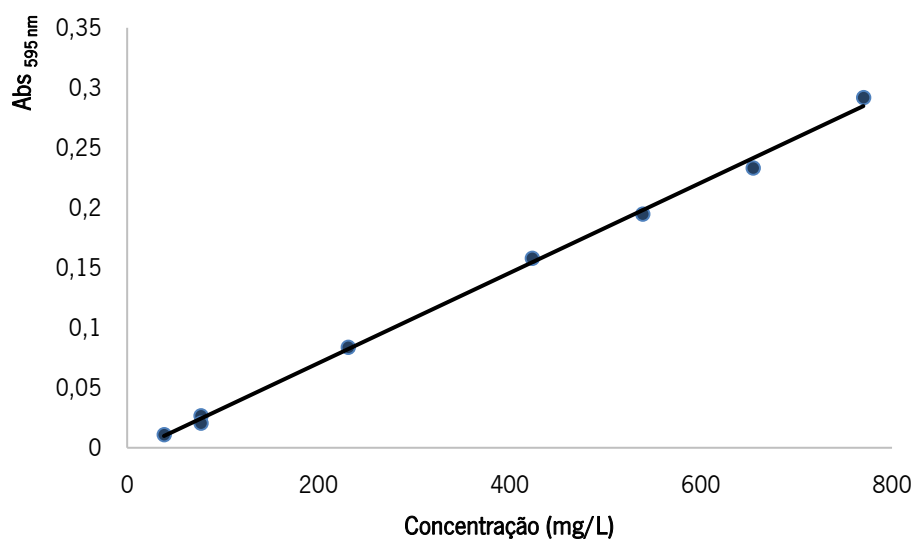
\*4) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*5) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

## **Anexo B: Retas de calibração**

## Anexo B1: Reta de calibração para o estudo da extração de gliadinas com tampão fosfato com SDS

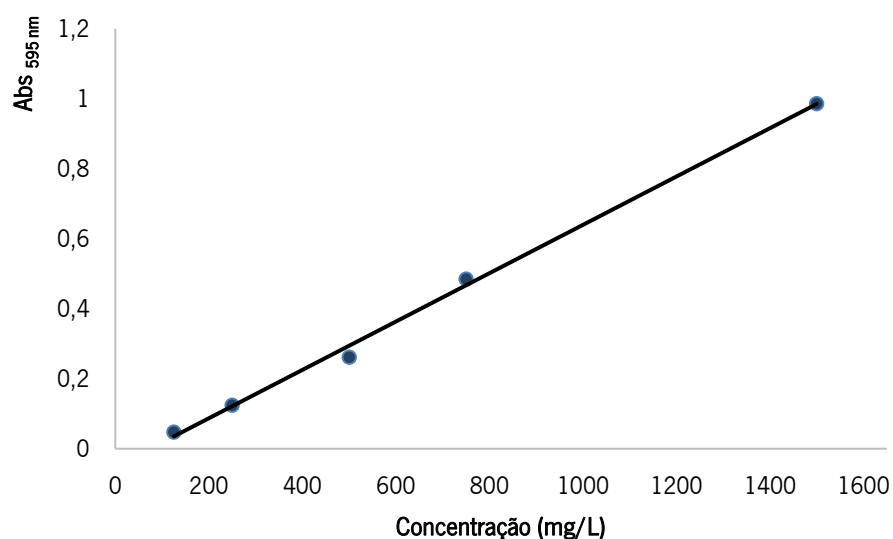
Na Figura B1 encontra-se representada a reta de calibração obtida a partir das soluções padrão de BSA (concentrações entre 21 mg/L e 700 mg/L) em tampão fosfato com SDS.



**Figura B1:** Reta de calibração com soluções padrão de BSA (concentrações entre 21 mg/L e 700 mg/L) preparadas em tampão fosfato com SDS.

## Anexo B2: Reta de calibração para o estudo da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica

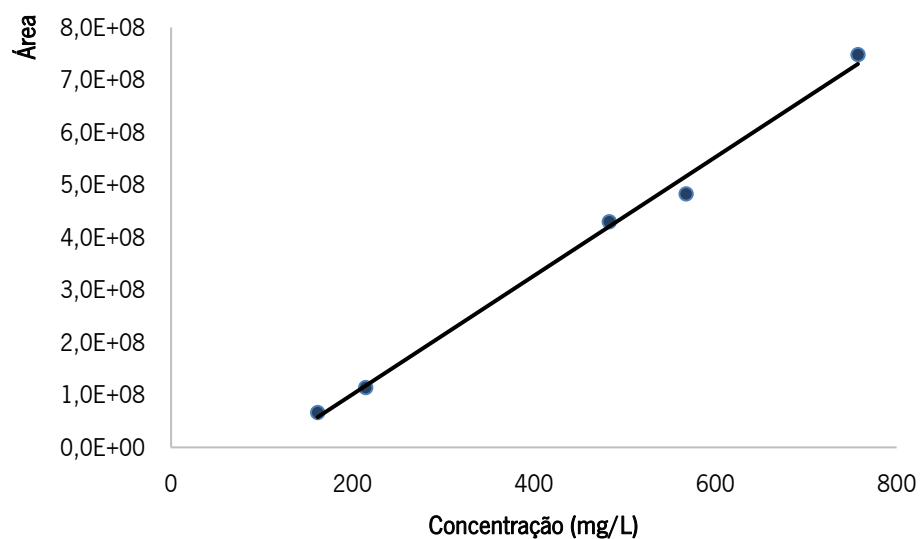
Na Figura B2 encontra-se representada a reta de calibração obtida a partir das soluções padrão de BSA (concentrações entre 125 mg/L e 1500 mg/L) em solução hidro-etanólica.



**Figura B2:** Reta de calibração com soluções padrão de BSA (concentrações entre 125 mg/L e 1500 mg/L), obtidas com o kit do MB, preparadas em solução hidro-etanólica.

### Anexo B3: Reta de calibração para a análise de gliadinas por HPLC

Na Figura B3 encontra-se representada a reta de calibração obtida a partir das soluções padrão de gliadina (concentrações entre 161 mg/L e 757 mg/L) em solução hidro-etanólica.



**Figura B3:** Reta de calibração com soluções padrão de gliadina (concentrações entre 161 mg/L e 757 mg/L) preparadas em solução hidro-etanólica e medidas por HPLC.

## **Anexo C: Resultados das extrações**



## Anexo C1: Resultados da extração de gliadinas com tampão fosfato com SDS

Na Tabela C1 encontram-se os resultados individuais, para as soluções padrão de gliadina e amostras de papas de bebê, obtidos na extração com o tampão fosfato com SDS.

**Tabela C1:** Resultados da extração de gliadinas com 10 mL de tampão fosfato com SDS de soluções padrão de gliadina e amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten

Substância	Código <sup>*1</sup>	m <sub>medida</sub> , g	[Amostra] g/L <sup>*2</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*3</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*4</sup>
Padrão	G1	0,0115	1,15	0,43	37,35
Padrão	G2	0,0113	1,13	0,44	38,71
Padrão	G3	0,0101	1,01	0,41	40,31
Padrão	G1.1	0,0122	1,22	0,44	35,96
Padrão	G2.1	0,0111	1,11	0,38	34,44
Padrão	G3.1	0,0103	1,03	0,37	35,99
Amostra	SG1	0,0149	1,49	0,24	15,93
Amostra	SG1	0,0123	1,23	0,21	17,37
Amostra	SG1	0,0112	1,12	0,17	15,29
Amostra	SG1.1	0,0132	1,32	0,28	21,50
Amostra	SG1.1	0,0135	1,35	0,32	23,42
Amostra	SG1.1	0,0141	1,41	0,30	21,04
Amostra	SG1.2	0,0130	1,30	0,25	18,90
Amostra	SG1.2	0,0105	1,05	0,18	17,02
Amostra	SG1.2	0,0142	1,42	0,25	17,94
Amostra	SG2	0,0113	1,13	0,12	10,59
Amostra	SG2	0,0112	1,12	0,11	9,84
Amostra	SG2	0,0142	1,42	0,16	10,93
Amostra	SG2.1	0,0103	1,03	0,18	17,92
Amostra	SG2.1	0,0119	1,19	0,15	12,89
Amostra	SG2.1	0,0141	1,41	0,23	16,51
Amostra	SG2.2	0,0114	1,14	0,12	10,78
Amostra	SG2.2	0,0112	1,12	0,15	13,70
Amostra	SG2.2	0,0125	1,25	0,17	13,65
Amostra	SG3	0,0126	1,26	0,16	12,63
Amostra	SG3	0,0140	1,40	0,13	9,54
Amostra	SG3	0,0131	1,31	0,16	12,04
Amostra	SG3.1	0,0127	1,27	0,15	11,90
Amostra	SG3.1	0,0134	1,34	0,16	11,92
Amostra	SG3.1	0,0140	1,40	0,18	13,21
Amostra	SG3.2	0,0130	1,30	0,15	11,21
Amostra	SG3.2	0,0101	1,01	0,10	9,87

\*1) G – gliadina; SG – sem glúten;

\*2) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*3) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*4) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela C1 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	m <sub>medida</sub> , g	[Amostra] g/L <sup>*2</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*3</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*4</sup>
Amostra	SG3.2	0,0119	1,19	0,12	9,76
Amostra	CG1	0,0115	1,15	0,04	3,53
Amostra	CG1	0,0110	1,10	0,02	1,94
Amostra	CG1	0,0107	1,07	0,01	0,80
Amostra	CG1.1	0,0127	1,27	0,07	5,57
Amostra	CG1.1	0,0104	1,04	0,08	7,38
Amostra	CG1.1	0,0107	1,07	0,05	5,07
Amostra	CG1.2	0,0112	1,12	0,05	4,85
Amostra	CG1.2	0,0101	1,01	0,03	2,65
Amostra	CG1.2	0,0127	1,27	0,07	5,76
Amostra	CG2	0,0120	1,20	0,16	13,52
Amostra	CG2	0,0151	1,51	0,19	12,31
Amostra	CG2	0,0128	1,28	0,16	12,61
Amostra	CG2.1	0,0124	1,24	0,18	14,85
Amostra	CG2.1	0,0142	1,42	0,23	16,03
Amostra	CG2.1	0,0101	1,01	0,18	18,11
Amostra	CG2.2	0,0128	1,28	0,14	11,30
Amostra	CG2.2	0,0140	1,40	0,15	10,58
Amostra	CG2.2	0,0119	1,19	0,14	12,13
Amostra	CG3	0,0134	1,34	0,18	13,13
Amostra	CG3	0,0156	1,56	0,17	11,08
Amostra	CG3	0,0115	1,15	0,13	11,22
Amostra	CG3.1	0,0105	1,05	0,12	11,29
Amostra	CG3.1	0,0107	1,07	0,23	21,09
Amostra	CG3.1	0,0132	1,32	0,15	11,48
Amostra	CG3.2	0,0153	1,53	0,18	11,81
Amostra	CG3.2	0,0119	1,19	0,13	10,84
Amostra	CG3.2	0,0111	1,11	0,11	9,59

\*1) SG – sem glúten; CG – com glúten;

\*2) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*3) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*4) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

## Anexo C2: Resultados da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica

Na Tabela C2 encontram-se os resultados individuais, para as soluções padrão de gliadina, amostras de papas de bebê e amostras de farinhas, obtidos na extração com solução hidro-etanólica.

**Tabela C2:** Resultados da extração de gliadinas com solução hidro-etanólica de soluções padrão de gliadina, amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten)

Substância	Código <sup>*1</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*2</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*3</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*4</sup>
Padrão	G1	0,5042	50	10,08	0,20	2,03
Padrão	G2	0,3012	50	6,02	0,18	3,03
Padrão	G3	0,2066	50	4,13	0,15	3,57
Padrão	G4	0,1021	50	2,04	0,11	5,26
Padrão	G5	0,0544	50	1,09	0,10	8,98
Padrão	G6	0,0233	50	0,47	0,07	15,04
Padrão	G1.1	0,5087	10	50,87	0,68	1,33
Padrão	G2.1	0,3068	10	30,68	0,47	1,54
Padrão	G3.1	0,2067	10	20,67	0,35	1,68
Padrão	G4.1	0,1078	10	10,78	0,25	2,29
Padrão	G5.1	0,0539	10	5,39	0,17	3,15
Padrão	G6.1	0,0265	10	2,65	0,12	4,57
Padrão	G1.2	0,5087	10	50,87	0,76	1,49
Padrão	G2.2	0,3009	10	30,09	0,57	1,89
Padrão	G3.2	0,2069	10	20,69	0,48	2,34
Padrão	G4.2	0,1065	10	10,65	0,30	2,85
Padrão	G5.2	0,0556	10	5,56	0,21	3,86
Padrão	G6.2	0,0256	10	2,56	0,16	6,31
Amostra	SG1	4,0075	60	66,79	0,09	0,13
Amostra	SG1.1	2,0141	10	201,41	0,09	0,04
Amostra	SG1.2	2,0141	10	201,41	0,12	0,06
Amostra	SG2	4,0033	60	66,72	0,10	0,15
Amostra	SG2.1	2,0156	10	201,56	0,13	0,06
Amostra	SG2.2	2,0020	10	200,20	0,15	0,08
Amostra	SG2.3	2,0178	10	201,78	0,19	0,10
Amostra	SG2	10,0042	50	200,08	0,41	0,21
Amostra	SG2.1	10,0035	50	200,07	0,21	0,10
Amostra	SG3	4,0016	60	66,69	0,12	0,18
Amostra	SG3.1	2,0057	10	200,57	0,13	0,07
Amostra	SG3.2	2,0278	10	202,78	0,15	0,07
Amostra	SG3.3	2,0079	10	200,79	0,16	0,08

\*1) G – gliadina; SG – sem glúten;

\*2) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*3) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*4) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela C2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*2</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*3</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*4</sup>
Amostra	SG3	10,0078	50	200,16	0,39	0,20
Amostra	SG3.1	10,0018	50	200,04	0,17	0,08
Amostra	SG4	2,0102	10	201,02	0,13	0,06
Amostra	SG4.1	2,0129	10	201,29	0,14	0,07
Amostra	SG5	2,0161	10	201,61	0,15	0,07
Amostra	SG5.1	2,0079	10	200,79	0,11	0,06
Amostra	SG6	2,0025	10	200,25	0,21	0,10
Amostra	SG6.1	2,0178	10	201,78	0,23	0,12
Amostra	CG1	4,0032	60	66,72	0,09	0,14
Amostra	CG1.1	2,0093	10	200,93	0,18	0,09
Amostra	CG1.2	2,0072	10	200,72	0,21	0,11
Amostra	CG1.3	2,0162	10	201,62	0,19	0,09
Amostra	CG1.4	2,0052	10	200,52	0,11	0,05
Amostra	CG2	4,0006	60	66,68	0,12	0,18
Amostra	CG2.1	2,0061	10	200,61	0,20	0,10
Amostra	CG2.2	2,0121	10	201,21	0,15	0,07
Amostra	CG2.3	2,0056	10	200,56	0,18	0,09
Amostra	CG2.4	2,0095	10	200,95	0,10	0,05
Amostra	CG3	4,0017	60	66,70	0,13	0,19
Amostra	CG3.1	2,0116	10	201,16	0,22	0,11
Amostra	CG3.2	2,0142	10	201,42	0,16	0,08
Amostra	CG3.3	2,0172	10	201,72	0,14	0,07
Amostra	CG3.4	2,0124	10	201,24	0,10	0,05
Amostra	CG4	2,0191	10	201,91	0,10	0,05
Amostra	CG5	2,0135	10	201,35	0,13	0,06
Amostra	CG6	2,0508	10	205,08	0,11	0,05
Farinha	PD1	1,5062	10	150,62	0,65	0,43
Farinha	PD2	1,0173	10	101,73	0,52	0,51
Farinha	PD3	0,5005	10	50,05	0,33	0,66
Farinha	PD4	0,3009	10	30,09	0,22	0,74
Farinha	PD5	0,2037	10	20,37	0,17	0,82
Farinha	PD1	10,0057	50	200,11	0,77	0,38
Farinha	PD2	7,0000	50	140,00	0,67	0,48
Farinha	PD3	4,0006	50	80,01	0,48	0,60
Farinha	PD4	1,0034	50	20,07	0,19	0,95
Farinha	PD5	0,5019	50	10,04	0,14	1,40
Farinha	PD6	0,3011	50	6,02	0,12	1,95
Farinha	PD1.1	10,0091	50	200,18	0,76	0,38
Farinha	PD2.1	7,0001	50	140,00	0,67	0,48
Farinha	PD3.1	4,0013	50	80,03	0,48	0,60
Farinha	PD4.1	1,0053	50	20,11	0,21	1,02
Farinha	PD5.1	0,5006	50	10,01	0,15	1,49
Farinha	PD6.1	0,3073	50	6,15	0,12	1,99

\*1) SG – sem glúten; CG – com glúten; PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2;

\*2) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*3) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*4) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

Tabela C2 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	m <sub>medida</sub> , g	V <sub>dissolução</sub> , mL	[Amostra] g/L <sup>*2</sup>	[Proteína Total] <sub>MB</sub> g/L <sup>*3</sup>	% Proteína Total Extraída <sup>*4</sup>
Farinha	P1	1,5010	10	150,10	0,53	0,35
Farinha	P2	1,0030	10	100,30	0,43	0,43
Farinha	P3	0,4999	10	49,99	0,23	0,47
Farinha	P4	0,3112	10	31,12	0,20	0,63
Farinha	P5	0,1973	10	19,73	0,17	0,85
Farinha	P1	8,0046	50	160,09	0,62	0,39
Farinha	P2	5,0067	50	100,13	0,50	0,50
Farinha	P3	2,0071	50	40,14	0,28	0,69
Farinha	P4	0,6021	50	12,04	0,09	0,72
Farinha	P5	0,2013	50	4,03	0,11	2,69
Farinha	P6	0,1082	50	2,16	0,09	4,23
Farinha	P1.1	8,0064	50	160,13	0,62	0,39
Farinha	P2.1	4,9999	50	100,00	0,49	0,49
Farinha	P3.1	2,0066	50	40,13	0,23	0,57
Farinha	P4.1	0,6006	50	12,01	0,14	1,15
Farinha	P5.1	0,2084	50	4,17	0,10	2,33
Farinha	P6.1	0,1081	50	2,16	0,10	4,44

\*1) PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2;

\*2) Concentração de Amostra usada nos ensaios;

\*3) Concentração de Proteína Total obtida, pelo MB, nos ensaios;

\*4) % Proteína Total Extraída obtida nos ensaios.

## **Anexo D: Resultados da análise por HPLC**

## Anexo D1: Resultados obtidos da análise de gliadinas por HPLC

Na Tabela D1 encontram-se os resultados individuais, obtidos por HPLC, para as amostras de papas de bebê e amostras de farinhas, na extração de gliadinas com solução hidro-etanólica.

**Tabela D1:** Resultados da análise de gliadinas por HPLC obtidos para amostras de papas de bebê com (CG) e sem (SG) glúten e amostras de farinhas (com glúten), extraídas em solução hidro-etanólica

Substância	Código <sup>*1</sup>	[Proteína Total] <sub>HPLC</sub> g/L <sup>*2</sup>	Nível de Gliadina mg/kg <sup>*3</sup>
Amostra	SG1	nd <sup>*4</sup>	nd
Amostra	SG1.1	nd	nd
Amostra	SG1.2	nd	nd
Amostra	SG2	nd	nd
Amostra	SG2.1	nd	nd
Amostra	SG2.2	0,113	56,44
Amostra	SG2.3	0,117	57,88
Amostra	SG2	0,111	11,10
Amostra	SG2.1	0,112	11,20
Amostra	SG3	nd	nd
Amostra	SG3.1	nd	nd
Amostra	SG3.2	0,114	56,37
Amostra	SG3.3	0,112	55,93
Amostra	SG3	0,111	11,05
Amostra	SG3.1	0,112	11,20
Amostra	SG4	nd	nd
Amostra	SG4.1	nd	nd
Amostra	SG5	nd	nd
Amostra	SG5.1	nd	nd
Amostra	SG6	nd	nd
Amostra	SG6.1	nd	nd
Amostra	CG1	nd	nd
Amostra	CG1.1	nd	nd
Amostra	CG1.2	nd	nd
Amostra	CG1.3	nd	nd
Amostra	CG1.4	nd	nd
Amostra	CG2	nd	nd
Amostra	CG2.1	nd	nd
Amostra	CG2.2	nd	nd
Amostra	CG2.3	nd	nd

\*1) SG – sem glúten; CG – com glúten;

\*2) Concentração de Proteína Total obtida, por HPLC, nos ensaios;

\*3) Nível de Gliadina obtido nos ensaios;

\*4) nd – não detectado.

Tabela D1 (continuação)

Substância	Código <sup>*1</sup>	[Proteína Total] <sub>HPLC</sub> g/L <sup>*2</sup>	Nível de Gliadina mg/kg <sup>*3</sup>
Amostra	CG2.4	nd <sup>*4</sup>	nd
Amostra	CG3	nd	nd
Amostra	CG3.1	nd	nd
Amostra	CG3.2	nd	nd
Amostra	CG3.3	nd	nd
Amostra	CG3.4	nd	nd
Amostra	CG4	nd	nd
Amostra	CG5	nd	nd
Amostra	CG6	nd	nd
Farinha	PD1	0,187	123,83
Farinha	PD2	0,312	306,80
Farinha	PD3	0,220	438,59
Farinha	PD4	0,163	540,39
Farinha	PD5	0,139	680,18
Farinha	PD1	0,141	14,14
Farinha	PD2	0,204	29,09
Farinha	PD3	0,153	38,19
Farinha	PD4	0,123	123,02
Farinha	PD5	0,130	258,65
Farinha	PD6	0,123	407,63
Farinha	PD1.1	0,260	26,00
Farinha	PD2.1	0,380	54,25
Farinha	PD3.1	0,221	55,15
Farinha	PD4.1	0,135	134,69
Farinha	PD5.1	0,142	283,37
Farinha	PD6.1	0,116	378,61
Farinha	P1	0,308	205,37
Farinha	P2	0,234	233,73
Farinha	P3	0,170	339,52
Farinha	P4	0,159	510,26
Farinha	P5	0,149	755,96
Farinha	P1	0,138	17,21
Farinha	P2	0,194	38,74
Farinha	P3	0,155	77,33
Farinha	P4	0,115	191,65
Farinha	P5	nd	nd
Farinha	P6	0,115	1061,21
Farinha	P1.1	0,374	46,73
Farinha	P2.1	0,291	58,21
Farinha	P3.1	0,174	86,90
Farinha	P4.1	0,128	213,49
Farinha	P5.1	nd	nd
Farinha	P6.1	nd	nd

\*1) CG – com glúten; PD – farinha marca 1; P – farinha marca 2;

\*2) Concentração de Proteína Total obtida, por HPLC, nos ensaios;

\*3) Nível de Gliadina obtido nos ensaios;

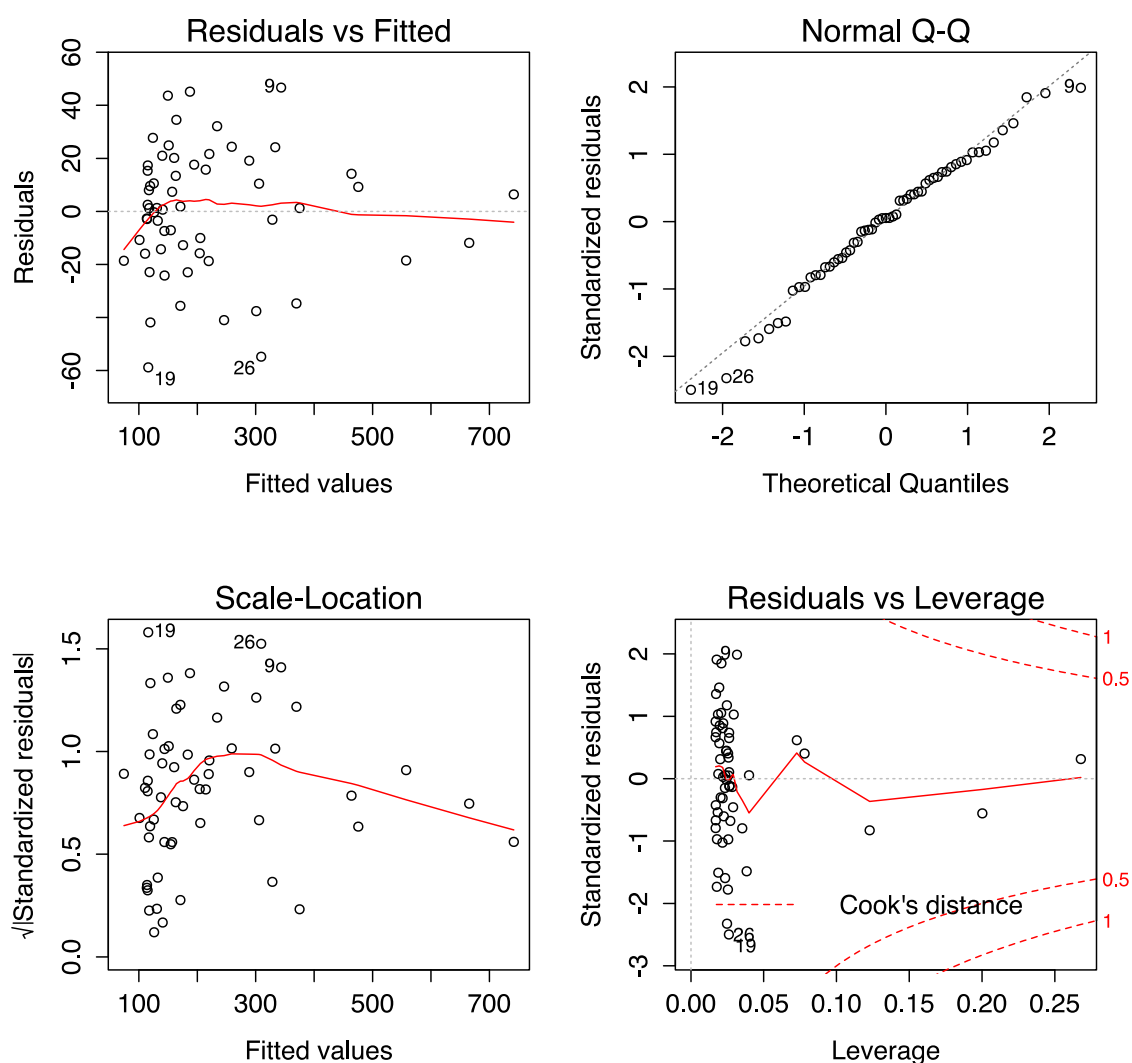
\*4) nd – não detectado.



## **Anexo E: Modelos de regressão linear**

## Anexo E1: Modelo de regressão linear múltipla na análise de gliadinas usando espectros UV-Vis

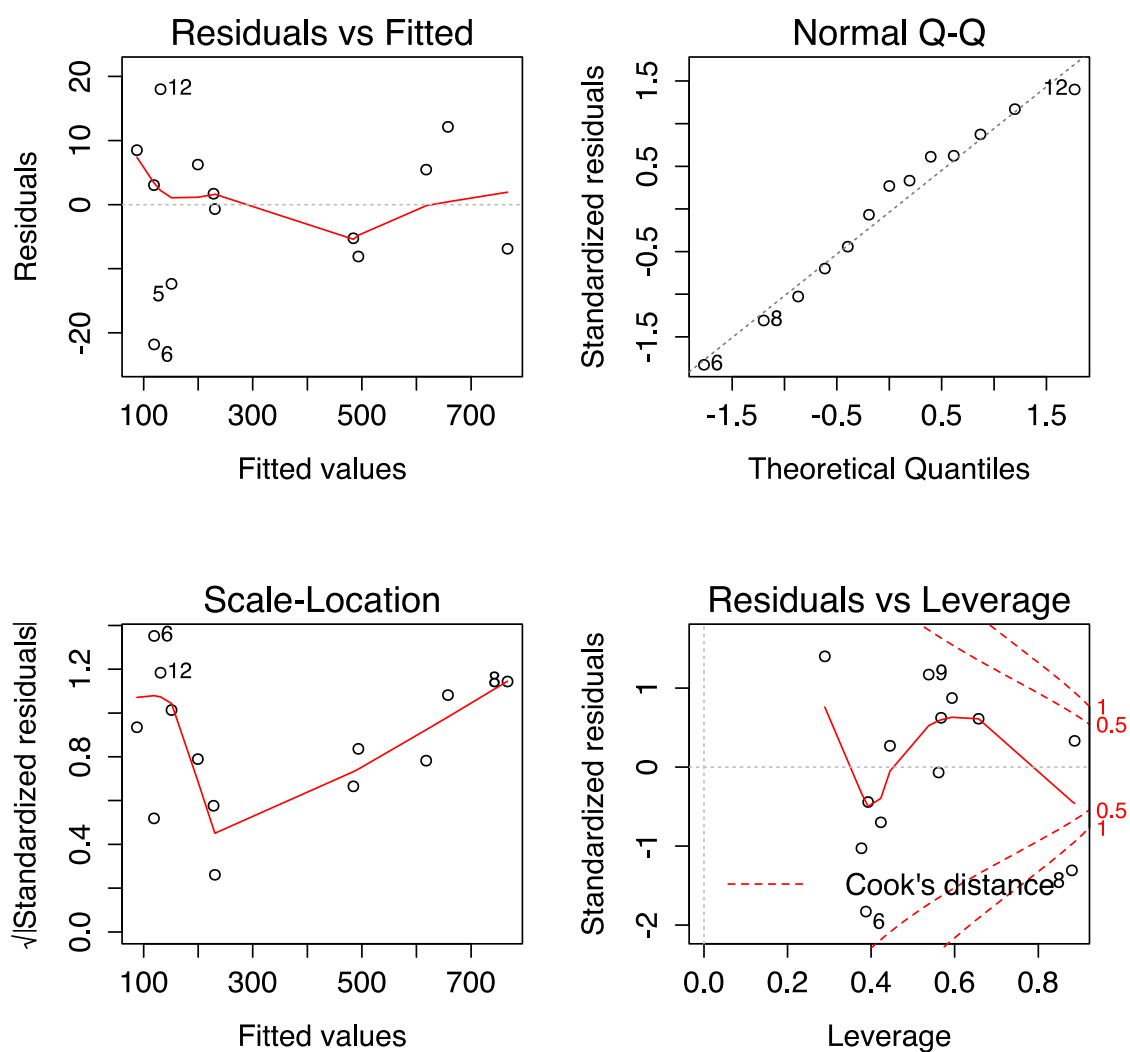
Na Figura E1 encontram-se os gráficos que permitem a validação do modelo de regressão linear múltipla para a quantificação das concentrações de gliadinas nos extratos hidro-etanólicos através do método MB, usando dados do espectro UV-Vis.



**Figura E1:** Resultados obtidos na validação do modelo de regressão linear múltipla para a quantificação das concentrações de gliadinas usando espectros UV-Vis.

## Anexo E2: Modelo de regressão linear múltipla na análise de gliadinas usando um sistema de multi-sensores

Na Figura E2 encontram-se os gráficos que permitem a validação do modelo de regressão linear múltipla para a quantificação das concentrações de gliadinas nos extratos hidro-etanólicos usando sinais da língua eletrônica.

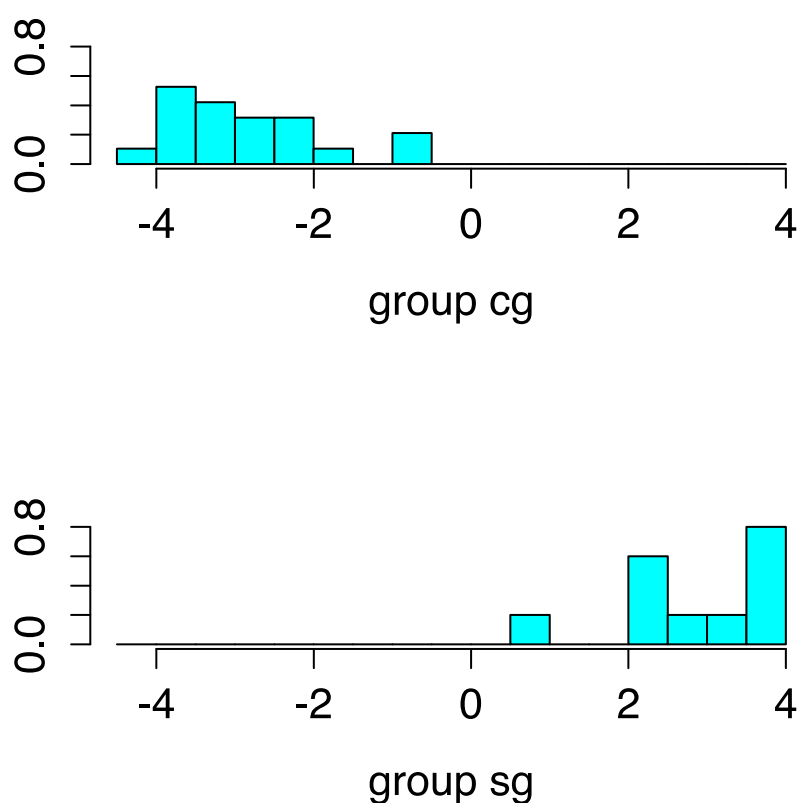


**Figura E2:** Resultados obtidos na validação do modelo de regressão linear múltipla para a quantificação das concentrações de gliadinas usando um sistema de multi-sensores.

## **Anexo F: Discriminação de produtos alimentares**

## Anexo F1: Discriminação de produtos alimentares na análise de gliadinas por sistema de multi-sensores

Na Figura F1 encontram-se os gráficos que permitem verificar a discriminação entre produtos alimentares com (*group cg*) e sem (*group sg*) glúten usando dados analíticos obtidos com a língua eletrónica.



**Figura F1:** Discriminação entre produtos alimentares com (*group cg*) e sem (*group sg*) glúten usando dados analíticos obtidos com a língua eletrónica.